



УДК 577.113(7+4)

## ПРОБЛЕМЫ СИНТЕЗА ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ПРИ РЕАЛИЗАЦИИ АНХИМЕРНОГО ЭФФЕКТА

© 2021 г. Е. С. Дюдеева\*, А. С. Павлова\*,

М. С. Купрюшкин\*, Д. В. Пышный\*, \*\*, И. А. Пышная\*.,#

\*ФГБУН “Институт химической биологии и фундаментальной медицины” СО РАН,  
Россия, 630090 Новосибирск, просп. акад. Лаврентьева, 8

\*\*Новосибирский научно-исследовательский государственный университет,  
Россия, 630090 Новосибирск, ул. Пирогова, 1

Поступила в редакцию 27.08.2020 г.

После доработки 09.09.2020 г.

Принята к публикации 11.09.2020 г.

Установлено, что наличие свободной ОН-группы на 3'-концевом остатке замещенного этиленгликолевого фрагмента в составе производного фосфорилгуанидинового олигодезоксирибонуклеотида является фактором, определяющим нестабильность структуры целевого олигонуклеотидного продукта в условиях стандартного протокола деблокирования. Показано, что основными побочными продуктами реализации такого анхимерного эффекта ОН-группы являются продукты реакции трансэтерификации фосфорилгуанидинового (ФГ) звена, несущего остаток О-замещенного этиленгликоля. Данные масс-спектрометрического анализа показывают, что в щелочных условиях происходит накопление производных, лишенных остатка  $N,N,N',N'$ -замещенного гуанидина (1,3-диметилимидазолидин-2-имин, DMI), либо всего 3'-концевого ФГ-содержащего нуклеотидного звена.

*Ключевые слова:* модифицированные олигонуклеотиды, фосфорилгуанидины, масс-спектрометрия, анхимерный эффект

DOI: 10.31857/S0132342321020093

### ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день широкий спектр научно-исследовательских и прикладных задач тем или иным образом задействует аналоги нуклеиновых кислот (НК) – синтетические олигонуклеотиды (ОН), которые при помощи различных химических модификаций наделяют необходимыми дополнительными функциональными свойствами. Введение химических модификаций в ОН позволяет “регулировать” их свойства в соответствии с решаемой задачей [1, 2]. Например, стабильность ОН по отношению к нуклеазам достигается при введении фосфотиоатных [3], 2'-ОМе- и 2'-F-нуклеотидных звеньев [4]. Для повышения сродства олигонуклеотида к комплементарной НК-

мишени используют различные модификации углеводородного остова (например, “замкнутые” нуклеотидные звенья [5]). Наличие пептидилнуклеиновых остатков [6], морфолиновых нуклеотидов [7] или фосфорилгуанидиновых остатков [8, 9] в составе ОН приводит к эффективной гибридизации ОН с НК-мишенью в условиях растворов с низкой ионной силой. Введение различных нуклеотидных вставок в состав ОН направлено изменяет их гибридизационные свойства [10]. Олигонуклеотиды, несущие остаток биотина [11], широко используют для получения функционализированных поверхностей биосенсоров, биочипов и т.д.

Следует заметить, что синтез производных ОН, содержащих сразу несколько различных модификаций, часто является нетривиальной задачей, тем более в условиях стандартного автоматического амидофосфитного синтеза олигонуклеотидов: использование коммерчески доступных нуклеотидных мономеров и полимерных носителей накладывает свои ограничения. Так, мы обнаружили, что выход целевого продукта синтеза фосфорилгуанидинового олигодезоксирибонуклеотида (ФГО), в составе которого присутствует 3'-концевая не-

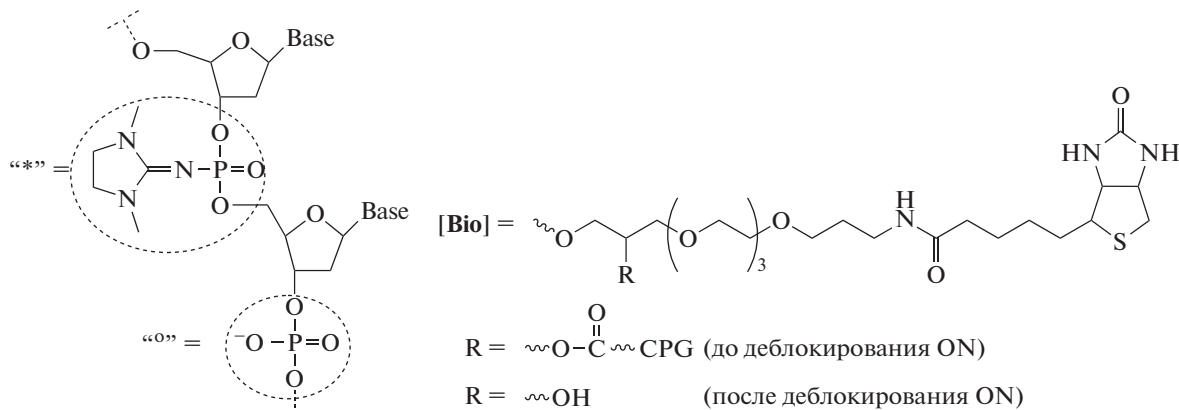
Сокращения: СРГ – стекло с контролируемым размером пор; DMI – 1,3-диметилимидазолидин-2-имин, остаток  $N,N,N',N'$ -замещенного гуанидина; ESI MS – метод масс-спектрометрии с электроспрей-ионизацией; ОН – олигонуклеотид; НК – нуклеиновая кислота, префикс d (дезоксирибо-) опущен (если не указано иное); ОФХ – обращенно-фазовая хроматография; ФГ – фосфорилгуанидиновое звено; ФГО – фосфорилгуанидиновые олигодезоксирибонуклеотиды.

# Автор для связи: (эл. почта: pyshnaya@niboch.nsc.ru).

(a)

ON	Последовательность (5'→3')
<i>N26<sup>o</sup></i>	C <sup>o</sup> T <sup>o</sup> T <sup>o</sup> T <sup>o</sup> C <sup>o</sup> G <sup>o</sup> C <sup>o</sup> T <sup>o</sup> C <sup>o</sup> T <sup>o</sup> G <sup>o</sup> G <sup>o</sup> T <sup>o</sup> C <sup>o</sup> C <sup>o</sup> G <sup>o</sup> T <sup>o</sup> C <sup>o</sup> T <sup>o</sup> T <sup>o</sup> G <sup>o</sup> C <sup>o</sup> G <sup>o</sup> C <sup>o</sup> C <sup>o</sup> -[Bio]
<i>N26<sup>*</sup></i>	C*T*T*T*C*G*C*T*C*T*G*G*T*C*C*G*T*C*T*T*G*C*G*C*C*- [Bio]
<i>N25*1<sup>o</sup></i>	C*T*T*T*C*G*C*T*C*T*G*G*T*C*C*G*T*C*T*T*G*C*G*C*C <sup>o</sup> - [Bio]

(б)



**Рис. 1.** (a) – Обозначения и нуклеотидная последовательность исследуемых олигодезоксирибонуклеотидов, где “o” – нативная фосфатная группа, “\*” – фосфорилгуанидиновая группа; (б) – основные структурные элементы исследуемых олигонуклеотидов. Base – азотистые основания, CPG – полимерный носитель, стекло с контролируемым размером пор.

нуклеотидная вставка, содержащая этиленгликолевый линкер (рис. 1), значительно ниже такового для нативного олигонуклеотида. Ранее мы провели детальный анализ превращений, реализующихся при получении ФГО в рамках автоматического ДНК-синтеза [12]. С помощью модельных химических соединений было установлено, что нестабильной формой фосфорилгуанидина является заряженный триэфирный фосфорилгуанидиневый фрагмент, перевод которого в электронейтральную диэфирную форму обеспечивает стабильность ФГ-звена в условиях деблокирования, повышая выход целевого ON.

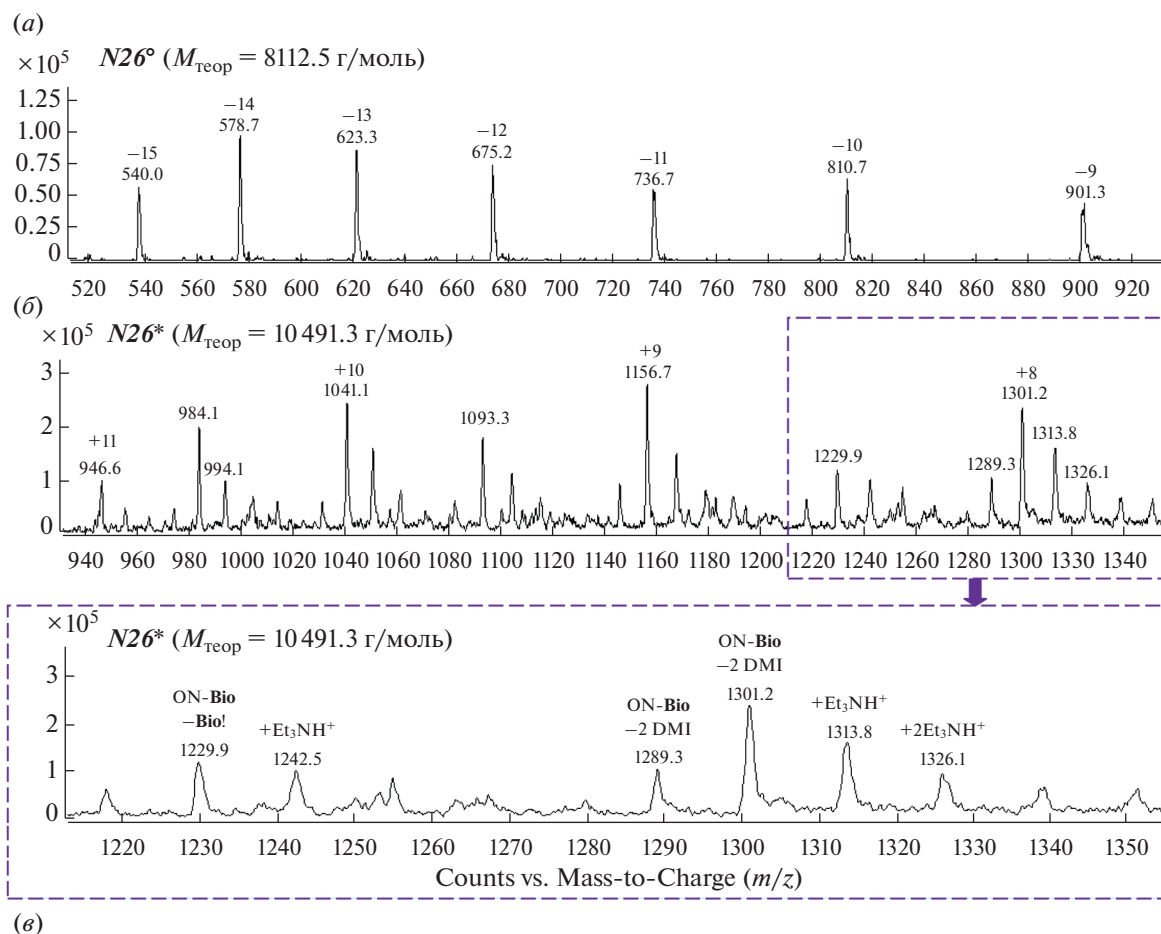
Данная работа направлена на исследование проблемы существенного уменьшения выхода целевого продукта синтеза ФГО, содержащего 3'-концевой нуклеотидный фрагмент, и выявление факторов, обеспечивающих результативность синтеза этих производных. С использованием методов масс-спектрометрического анализа, SDS-гель-электрофореза и обращенно-фазовой хроматографии (ОФХ) установлено, что ФГ-звено, находящееся вблизи нуклеотидной вставки на основе замещенного фрагмента этиленгликоля (рис. 1), нестабильно в условиях стандартного

протокола деблокирования ON, т.е. при обработке концентрированным водным раствором аммиака.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Чтобы разобраться в проблеме существенного снижения выхода 3'-функционализированных производных ФГО на автоматическом ДНК/РНК-синтезаторе, мы синтезировали 3'-биотиновые производные 26-звенного олигодезоксирибонуклеотида, остов которого содержал либо только заряженные фосфатные группы (*N26<sup>o</sup>*, рис. 1a), либо только ФГ-остатки (*N26<sup>\*</sup>*, рис. 1a). Синтез проводили по амидофосфитному протоколу, описанному в работах [8, 12, 13].

Все олигонуклеотиды были синтезированы с использованием коммерчески доступного CPG-носителя (см. “Эксперим. часть”). В состав данного носителя входит нуклеотидное звено, содержащее биотиновый остаток на триэтиленгликолевом линкере (рис. 1б), и в ходе автоматического синтеза ДНК к нему присоединяются нуклеотиды, образуя необходимую последовательность. Разрыв связи полученных олигонуклеотидов с CPG-носителем и дальнейшее деблокирование защитных групп олигонуклеотида осуществляли в условиях



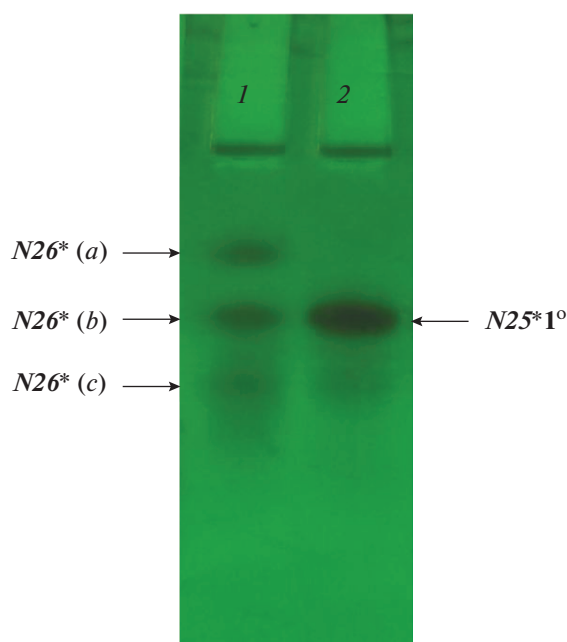
$m/z$	$z$	$M_{\text{ион}}$	Возможные продукты деструкции $N26^*$
1229.9	+8	9839.2	$[\text{ON}] + 7[\text{H}^+] + [\text{Li}^+]$
1289.3	+8	10314.4	$[\text{ON-Bio}] + 7[\text{H}^+] + [\text{Li}^+] - 2[\text{DMI}]$
1301.1	+8	10408.8	$[\text{ON-Bio}] + 7[\text{H}^+] - [\text{DMI}] + [\text{Li}^+]$

Рис. 2. Результаты анализа олигодезоксирибонуклеотидов  $N26^{\circ}$  (а) и  $N26^*$  (б) методом ESI MS; (в) – значения  $m/z$ , соответствующие основным продуктам деструкции  $N26^*$  – утере нуклеотидного звена, одного или двух остатков DMI.

стандартного протокола деблокирования ON, т.е. при обработке концентрированным водным раствором аммиака. Целевой продукт синтеза, в состав которого входило нуклеотидное биотиновое звено в виде, приведенном на рис. 1б ( $R = \text{OH}$ ), выделяли методом ВЭЖХ на обращенной фазе в линейном градиенте ацетонитрила. Характеризацию выделенных производных олигонуклеотидов проводили методом масс-спектрометрии с электроспрей-ионизацией (ESI MS). Немодифицированный олигомер  $N26^{\circ}$  детектировали в виде полианионов. В случае ФГО  $N26^*$  в анализируемый образец добавляли муравьиную кислоту и детектировали образуемые поликатионы. Стоит отметить, что ФГ-остатки, в отличие от амидофосфат-

ных аналогов, стабильны в кислых и щелочных условиях [8, 13]. Масс-спектры олигонуклеотидов  $N26^{\circ}$  и  $N26^*$  приведены на рис. 2.

В случае нативного  $N26^{\circ}$  полученный профиль масс-спектра содержал группу пиков, соответствующих различным зарядовым формам ( $z = -15 \dots -9$ ) данного олигонуклеотида (рис. 2а). Сопоставимых по интенсивности пиков, соответствующих побочным продуктам, в спектре не обнаруживали. Масс-спектр  $N26^*$  имел сложный вид (рис. 2б). Для каждой зарядовой формы мы обнаружили группы пиков, отличающихся по значениям  $m/z$ . Рассмотрим одну из таких групп более подробно. Прежде всего, видно, что ФГО детектируется как



**Рис. 3.** Результат электрофоретического анализа биотинированных ФГО в 15%-ном денатурирующем SDS-ПААГ: 1 –  $N26^*$ , 2 –  $N25^*1^\circ$ .

поликатион, содержащий в т.ч. катионы триэтил-аммония (“ТЕА”, компонент буферной смеси). За счет этого мы наблюдали смещение  $m/z$  в сторону больших значений. Например, два пика с отношением  $m/z$  1313.8 и 1326.1 являются своего рода “аналогами” пика  $m/z$  1301.2. Таким образом, сигналы  $m/z$  1301.2, 1313.8 и 1326.1 отвечают одной и той же зарядовой форме  $z = +8$  одной молекулы, но с различными “видами” катионов, вошедших в структуру детектированного поликатиона:  $[M + H]^{+8}$ ,  $[M + TEA + H]^{+8}$ ,  $[M + 2TEA + H]^{+8}$  соответственно. В спектре  $N26^*$  присутствовали также и пики с меньшими значениями  $m/z$ , что свидетельствовало, вероятно, о деградации целевого продукта синтеза. При этом мы не обнаружили значения массы молекулярных ионов, соответствующих полноразмерному продукту синтеза, в котором содержались бы все 25 остатков  $N,N,N',N'$ -замещенного гуанидина (1,3-диметил-имидазолидин-2-имин, DMI): все наблюдаемые пики соответствовали утере либо хотя бы одного остатка DMI, либо всего биотин-содержащего нуклеотидного звена (рис. 2*в*).

Дополнительно был проанализирован в режиме детекции поликатионов олигонуклеотид  $N26^\circ$ . В полученном спектре отсутствовали пики, свидетельствующие о деградации этого немодифицированного олигонуклеотида (данные не приведены). Поскольку процедуры пробоподготовки и самого масс-спектрометрического анализа не приводили к деградации биотинилированного олигонуклеотида, то, вероятно, в случае  $N26^*$  именно

непосредственная близость ФГ-группы и нуклеотидного звена на 3'-конце ОН приводит к разрушению целевого продукта на каком-то из этапов синтеза и/или выделения олигонуклеотида. Чтобы проверить это предположение, был синтезирован олигодезоксирибонуклеотид  $N25^*1^\circ$  (рис. 1*а*), в котором между первым (с 3'-конца последовательности) нуклеотидным и нуклеотидным звеньями был сохранен немодифицированный фосфодиэфирный остаток. Постсинтетическую обработку и выделение целевого продукта проводили согласно приемам олигонуклеотидного синтеза, описанным выше. Полученный продукт  $N25^*1^\circ$  был также охарактеризован методом масс-спектрометрии, и в спектре не было обнаружено пиков, отвечающих “утере” нуклеотидного звена (данные не приведены). С помощью метода SDS-гель-электрофореза, адаптированного нами ранее для анализа частично заряженных и электронейтральных аналогов олигонуклеотидов [14], было проведено сравнение продуктов синтеза  $N26^*$  и  $N25^*1^\circ$  (рис. 3).

Для полностью ФГ-замещенного  $N26^*$  (рис. 3, дорожка 1) мы наблюдали три отдельных пятна. Вероятно, они соответствуют обнаруженным с помощью масс-спектров продуктам распада, т.е. либо утере биотин-содержащего звена с сохранением всех остатков DMI, либо, наоборот, утере одного или двух остатков DMI с сохранением биотинированного звена (рис. 2*б*). Действительно, при отсутствии нуклеотидного звена олигонуклеотид  $N26^*$  сохраняет свою электронейтральность, и верхнее пятно (а) в дорожке 1 может соответствовать ОН с незаряженным остовом. В случае утери остатков DMI остов  $N26^*$  приобретает отрицательный заряд, и это должно привести к увеличению электрофоретической подвижности. Соответственно, пятна (б) и (с) могут быть продуктами деструкции, в которых сохранено нуклеотидное звено, но утерян один или два остатка DMI. В дорожке 2, где присутствует аналогичный по нуклеотидной последовательности ФГО  $N25^*1^\circ$ , есть только одно пятно, и его электрофоретическая подвижность полностью совпадает с таковой для пятна (б) в дорожке 1. Таким образом, видно, что при наличии ФГ-группы в 3'-концевой позиции вблизи нуклеотидного звена  $N26^*$  деградирует с образованием трех продуктов в сопоставимых количествах. Принимая во внимание этот факт, а также химическую структуру терминального нуклеотидного звена (рис. 1*б*), мы предположили, что, вероятно, реализуется “анхимерное содействие”, согласно которому деструкция ФГ-группы ускоряется соседней ОН-группой линкера на основе замещенного этиленгликолевого остатка, входящего в состав нуклеотидного звена.

**Модель деструкции 3'-функционализированных производных ФГО.** ФГ-группа в межнуклеозид-

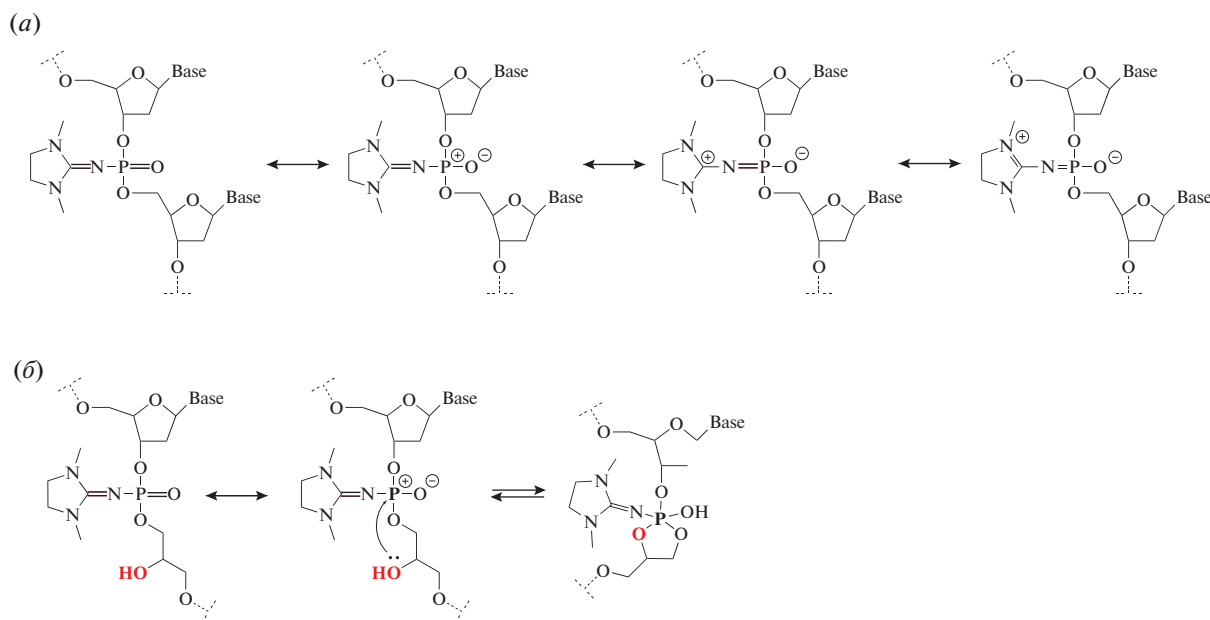


Рис. 4. (а) – Резонансные структуры, возможные для ФГ-звена, расположенного в межнуклеозидной позиции; (б) – схема внутримолекулярного образования циклического эфира фосфорной кислоты.

ном положении в целом является электронейтральной после проведения деблокирования ON, но в то же время вероятно, что в ФГ-группе может реализовываться распределение электронной плотности согласно резонансным структурам, приведенным на рис. 4а.

Остаток DMI в данной схеме может выступать в роли донора электронов по мезомерному эффекту, стабилизируя положительный заряд, возникший на атоме фосфора в результате поляризации двойной связи P=O. Таким образом, возможно, что в ФГ-группе двойная связь P=O ионизована в большей степени, чем в составе немодифицированной фосфатной группы. В том случае, когда ФГ-группа находится вблизи нуклеотидного звена (рис. 4б), становится возможной внутримолекулярная атака свободной гидроксигруппы, входящей в состав линкера, по атому фосфора. Это может привести к образованию циклического эфира фосфорной кислоты, который в дальнейшем может деградировать с расщеплением одной из связей P–O или P–N, что и привело бы к утере либо остатка DMI, либо нуклеотидного звена. Аналогичный эффект гидролиза связей P–O или P–N при реализации анхимерного эффекта карбоксильной и гидроксигрупп описан в работах [15, 16].

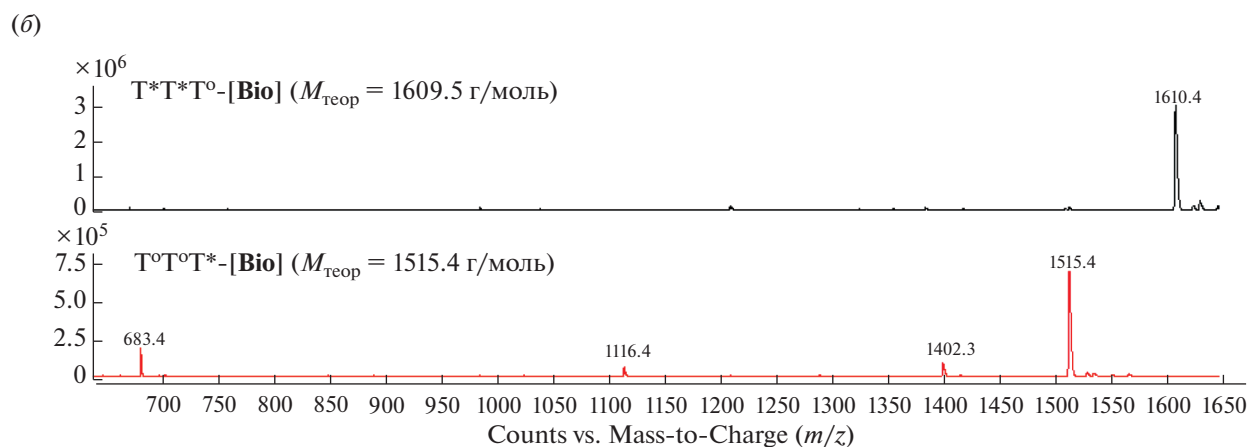
Для проверки этой гипотезы мы синтезировали модельные гомо- и гетеротринуклеотиды, содержащие 3'-концевое нуклеотидное звено и остатки DMI в различных позициях (рис. 5а). Все указанные тринуклеотиды были получены с использованием стандартного автоматического фосфитамидного метода синтеза олигонуклеотидов,

обработаны концентрированным раствором аммиака (2 ч, 56°C), и каждая реакционная смесь (без предварительного разделения компонентов реакционной смеси) была проанализирована методом масс-спектрометрии.

На примере гомотимидилатных олигонуклеотидов T\*<sup>+</sup>T\*<sup>+</sup>T<sup>0</sup>-[Bio] и T<sup>0</sup>T\*<sup>+</sup>T\*<sup>+</sup>-[Bio] рассмотрим результаты масс-спектрометрического анализа в режиме детектирования анионов (рис. 5б). Для данных производных тритимидилатов возможны только две зарядовые формы ( $z = -1$  или  $-2$ ), поскольку структуры содержат лишь одну или две фосфатные группы, способные нести отрицательный заряд. В случае, когда остатки DMI находятся только между нуклеотидными звеньями, в профиле масс-спектра наблюдается пик, соответствующий полноразмерному продукту синтеза T\*<sup>+</sup>T\*<sup>+</sup>T<sup>0</sup>-[Bio]. Других значений  $m/z$ , свидетельствующих о деградации целевого продукта, в спектре не наблюдали.

Во втором случае, когда ФГ-группа находится на 3'-конце рядом с нуклеотидной вставкой, в полученном масс-спектре присутствует как пик, соответствующий целевому продукту T<sup>0</sup>T\*<sup>+</sup>T\*<sup>+</sup>-[Bio] ( $m/z$  1515.4,  $z = -1$ ), так и другие пики с меньшими значениями  $m/z$ . Ни один из них не является второй зарядовой формой целевого продукта с  $z = -2$ , поскольку в этом случае отношение  $m/z$  имело бы значение  $\sim 756.7$ . Следовательно, другие пики также соответствуют зарядовому числу  $z = -1$ , но с меньшей молекулярной массой, т.е. снова наблюдается деградация целевого продукта.

(a) Последовательность (5'→3')	$M_{\text{теор}}$ , Г/МОЛЬ
T* <sup>o</sup> T* <sup>o</sup> T <sup>o</sup> -[Bio]	1609.5
T <sup>o</sup> T <sup>o</sup> T*-[Bio]	1515.4
C <sup>o</sup> A* <sup>o</sup> T <sup>o</sup> -[Bio]	1509.4
C <sup>o</sup> A <sup>o</sup> T*-[Bio]	1509.4



**Рис. 5.** (a) – Последовательности и теоретические молекулярные массы модельных биотиновых гомо- и гетеротринуклеотидов с различным расположением ФГ-звена; (б) – результаты анализа биотиновых тритимидилатов T\*<sup>o</sup>T\*<sup>o</sup>T<sup>o</sup>-[Bio] и T<sup>o</sup>T<sup>o</sup>T\*-[Bio] методом ESI MS.

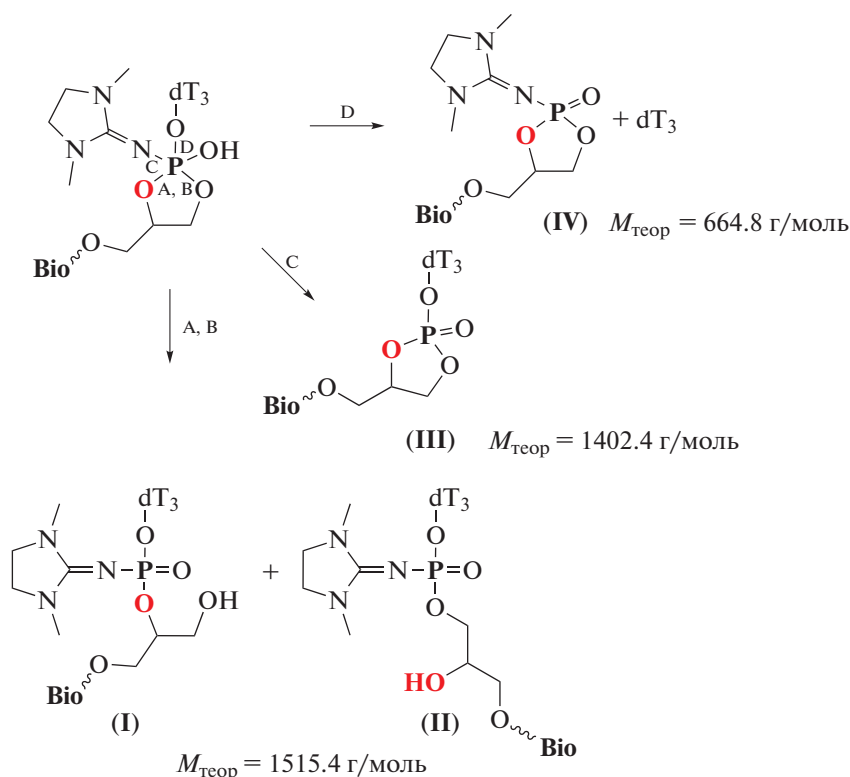
Согласно описанной выше гипотезе, тринуклеотид T<sup>o</sup>T<sup>o</sup>T\*-[Bio] мог бы образовать циклический эфир фосфорной кислоты. В процессе обработки концентрированным водным раствором аммиака возможен разрыв одной из связей P–O или P–N. На рис. 6 приведены возможные продукты деградации в зависимости от того, какая связь была разорвана (пути А, В, С, D). Также на рис. 6 указаны теоретические молекулярные массы биотин-содержащих продуктов распада.

Весьма вероятно, что образующиеся по пути С или D циклические триэфир (III) и фосфорилгуанидин (IV) могут быть также гидролизованы с образованием ациклических форм, что следует учитывать при анализе масс-спектров.

Так, помимо пика, соответствующего целевому продукту (II) (или его изомерной форме (I), образующейся в соответствии со схемой по пути В), наблюдается пик со значением  $m/z$  1402.3 (рис. 5б). Данное значение может соответствовать циклическому фосфату (III), образовавшемуся по пути С вследствие разрыва связи P–N и утери остатка DM1. Также в полученном спектре было обнаружено значение  $m/z$  683.4, что может соответствовать образованному в случае распада по пути D продукту (IV) в ациклической форме.

Таким образом, основываясь на данных масс-спектрометрического анализа реакционных смесей, полученных в результате синтеза T\*<sup>o</sup>T\*<sup>o</sup>T<sup>o</sup>-[Bio] и T<sup>o</sup>T<sup>o</sup>T\*-[Bio], можно утверждать, что непосредственная близость ФГ-группы и нуклеотидного звена, содержащего свободную гидроксигруппу в составе этиленгликолевого линкера, приводит к деструкции целевого продукта синтеза T<sup>o</sup>T<sup>o</sup>T\*-[Bio]. Значения масс, найденные для продуктов распада целевого ON, не противоречат предложенной схеме, основанной на внутримолекулярном образовании циклического эфира фосфорной кислоты при участии прилегающей гидроксигруппы нуклеотидного звена. Для гетеротринуклеотидов C<sup>o</sup>A\*<sup>o</sup>T<sup>o</sup>-[Bio] и C<sup>o</sup>A<sup>o</sup>T\*-[Bio] результаты анализа ESI MS ничем принципиально не отличались: деструкция наблюдалась только тогда, когда возможна внутримолекулярная нуклеофильная атака гидроксигруппы по ФГ-группе (с образованием пятичленного цикла).

На примере тринуклеотидов C<sup>o</sup>A\*<sup>o</sup>T<sup>o</sup>-[Bio] и C<sup>o</sup>A<sup>o</sup>T\*-[Bio], содержащих одну ФГ-группу, дополнительно рассматривали различные условия деблокирования (удаления с полимерного носителя) при 56°C, варьируя время (2 ч или ночь) об-



**Рис. 6.** Схема деструкции циклического эфира фосфорной кислоты с разрывом одной из связей А, В, С, D. Приведены теоретические молекулярные массы биотин-содержащих продуктов (I–IV).

работки концентрированным раствором аммиака. Кроме того, опробовали подход, предложенный в работе Vazhenov et al. [12]: последовательно обрабатывали ON безводным 50%-ным раствором триэтиламина в ацетонитриле (1 ч, 56°C), после чего удаляли триэтиламин и обрабатывали ON раствором аммиака (2 ч, 56°C). Такой подход позволяет провести селективное β-элиминирование цианэтильной защитной группы, не удаляя олигонуклеотид с полимерного носителя CPG, что, согласно данным работы Vazhenov et al. [12], “стабилизирует” ФГ-группу при дальнейшей обработке аммиаком. Все реакционные смеси анализировали методом ОФХ (рис. 7).

Видно, что олигонуклеотид C°A\*Г°-[Bio], в котором ФГ-группа расположена между нуклеотидными звеньями, практически не содержит побочных продуктов: на профиле хроматограммы присутствует один выраженный пик, время удерживания ~7.8 мин (рис. 7а). Профили хроматограмм идентичны как в случае двухчасовой обработки олигонуклеотида аммиаком, так и в случае обработки в течение ночи (рис. 7б). Таким образом, деблокирование C°A\*Г°-[Bio] происходит без деструкции целевого продукта, как и ожидалось согласно предложенной схеме (рис. 4).

В случае C°A\*Г\*-[Bio] после 2-часовой обработки аммиаком на хроматограмме наблюдаются три

сопоставимых по величине пика (рис. 7в). Один из них также имеет время удерживания ~7.9 мин, что соответствует полноразмерному продукту синтеза, остальные обладают меньшим временем удерживания. В случае последовательной обработки безводным раствором триэтиламина (для удаления β-цианэтильной защитной группы [12]) и затем аммиаком профиль хроматограммы в целом не изменялся (данные не приведены). Длительная обработка C°A\*Г\*-[Bio] аммиаком приводила к почти полному исчезновению пика на 7.9 мин (рис. 7г). Вероятно, это свидетельствует о том, что само по себе наличие остатка DMI возле атома фосфора благоприятствует внутримолекулярной нуклеофильной атаке гидроксигруппы, и дальнейшая деградация циклического эфира происходит необратимо, не приходя к равновесному состоянию. Данный факт накладывает ограничение на химические структуры, в состав которых возможно ввести остаток DMI: непосредственная близость ФГ-группы и заместителей, обладающих нуклеофильными свойствами, может привести к деградации целевого продукта. Например, весьма вероятно, что деградация будет происходить в случае синтеза ФГ-РНК, поскольку 2'-гидроксигруппа рибозы также может атаковать по межнуклеотидному атому фосфора, и введение

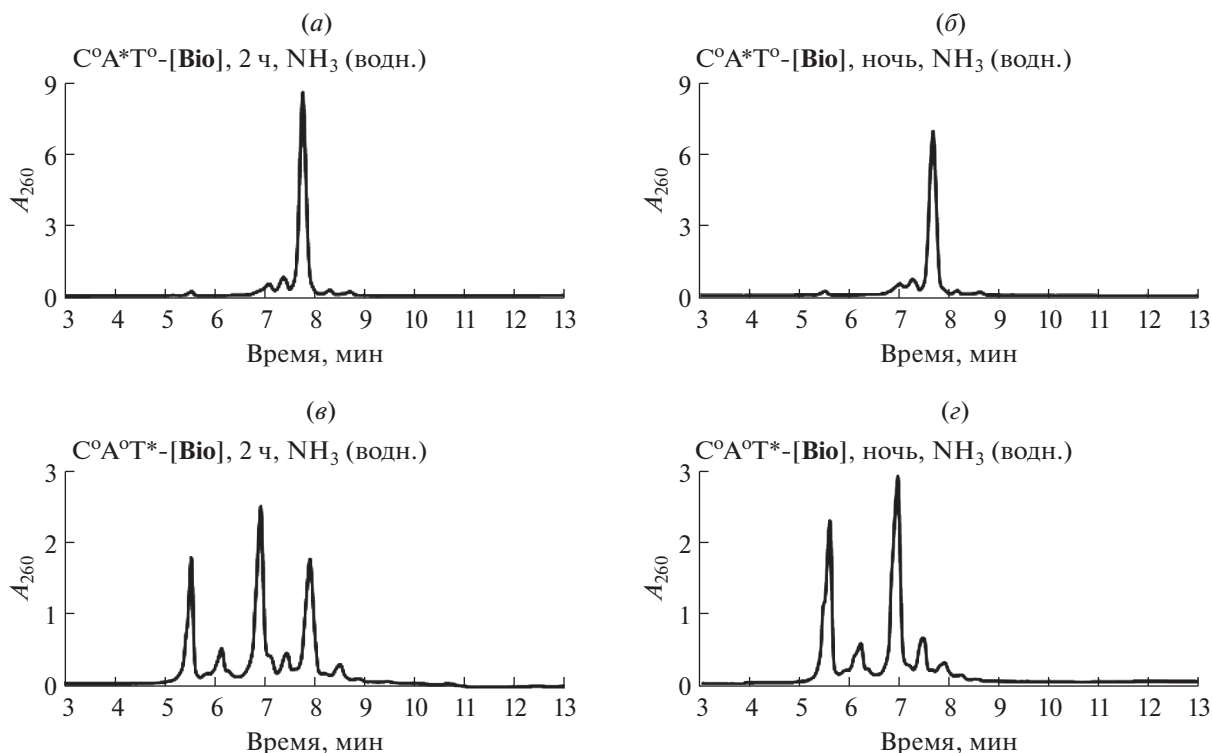


Рис. 7. Профили ОФХ, полученные в результате обработки гетеротринуклеотидов  $C^{\circ}A^{\circ}T^{\circ}$ -[Bio] и  $C^{\circ}A^{\circ}T^*$ -[Bio] водным раствором аммиака в течение 2 ч (а, в) или ночи (б, г) при  $56^{\circ}C$ .

остатков DMI, по-видимому, будет провоцировать этот процесс.

Таким образом, на примере модельных тринуклеотидов было получено экспериментальное подтверждение того, что непосредственная близость ФГ-группы и нуклеофильных заместителей в структуре олигонуклеотида приводит к разрушению целевого продукта в стандартных условиях деблокирования (обработки водным раствором аммиака). Для точного подтверждения механизма требуются дополнительные эксперименты, поскольку использованные в данной работе методы — масс-спектрометрия и ОФХ — не позволяют судить о конкретных структурных преобразованиях внутри молекулы. Тем не менее, имеющиеся экспериментальные данные согласованно и воспроизводимо указывают на нестабильность ФГ-звена в том случае, если возможна внутримолекулярная нуклеофильная атака по атому фосфора, и подтверждают анхимерное содействие ОН-группы. Эту особенность необходимо учитывать на стадии дизайна функциональных ON, содержащих остатки DMI в своей структуре, поскольку для 2'-ОМе ФГ-содержащего 26-звенного биотинилированного олигонуклеотида, содержащего такой же этиленгликолевый линкер в составе нуклеотидного звена, все описанные выше эффекты сохранялись (данные не приведены).

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Реактивы.** В работе были использованы ацетонитрил, триэтиламин (Fluka, Швейцария); мочевины, акриламид, уксусная кислота, персульфат аммония, ацетон, додецилсульфат натрия (ДиаЭМ, Россия);  $N,N'$ -метиленбисакриламид, бромфеноловый синий, борная кислота, ЭДТА,  $N,N$ -диметилформамид, ксиленианол, тетраметилэтилендиамин (Sigma, США); реактивы и растворители квалификации х.ч. и ос.ч. отечественного и импортного производства. Абсолютизирование растворителей проводили стандартными методами с последующим выдерживанием их над молекулярными ситами или гидридом кальция.

**Синтез олигонуклеотидов.** Синтез олигонуклеотидов проводили на автоматическом синтезаторе ASM800 (Биоссет, Россия) согласно стандартному протоколу 2-цианэтильного фосфитамидного метода, используя коммерческие дезоксирибонуклеозидные мономеры и биотин-содержащее пористое стекло (Biotin CPG; Primetech, Республика Беларусь). Олигонуклеотиды, содержащие ФГ-звенья, синтезировали, используя протокол, описанный нами ранее [8, 13].

**Деблокирование олигонуклеотидов.** 26-Звенные биотиновые олигонуклеотиды удаляли с полимерного носителя, обрабатывая полимер концентрированным водным раствором аммиака в течение



ночи при нагревании до 56°C. Для модельных биотиновых тритимидилатов обработку проводили в течение 2 ч при нагревании до 56°C. Гетеротринуклеотиды (С°А\*Т°-[Bio] и С°А\*Т\*-[Bio]) обрабатывали в течение 2 ч при 56°C, затем (если необходимо) выдерживали в концентрированном водном аммиаке в течение ночи. В независимом эксперименте тринуклеотид С°А\*Т\*-[Bio] обрабатывали сначала безводным раствором 50%-ного триэтиламина в ацетонитриле (1 ч, 56°C), затем удаляли раствор триэтиламина и обрабатывали С°А\*Т\*-[Bio] водным раствором аммиака (2 ч, 56°C).

**Хроматография.** Препаративное выделение (DMTr-on) 26-звенных биотиновых олигонуклеотидов осуществляли методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (офВЭЖХ) на хроматографе Agilent 1200 (Agilent, США). Использовали колонку (4.6 × 150 мм) с сорбентом Eclipse XDB-C18 (5 мкм; Agilent, США), элюировали в линейном градиенте концентрации ацетонитрила (0–90%) в 0.02 М растворе триэтиламмоний ацетата за 40 мин, скорость потока 1.5 мл/мин.

Для анализа реакционных смесей биотиновых гетеротринуклеотидов проводили аналитическую ОФХ на хроматографе Милихром А02 (Эконова, Россия) с использованием колонки (2 × 75 мм) с ProntoSIL 120-5-C18 (Эконова, Россия), элюировали в линейном градиенте концентрации ацетонитрила (0–55%) в 0.02 М водном растворе триэтиламмоний ацетата за 15 мин, скорость потока 150 мкл/мин, температура термостата 35°C. Выход хроматографических пиков детектировали по интенсивности оптического поглощения на длине волны 260, 280 и 300 нм.

**Масс-спектрометрия.** Молекулярные массы олигонуклеотидов определяли методом ESI MS на приборе Agilent G6410A LCMS/MS (Agilent, США). Для анализа олигонуклеотидов образцы растворяли в 20 мМ триэтиламмоний ацетате в 60%-ном водном ацетонитриле (до концентрации 0.1 мМ и объема 10 мкл). Анализ проводили с использованием 80%-ного водного ацетонитрила в качестве элюента при скорости потока 0.1 мл/мин в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов. Для анализа ФГО образец растворяли в 20 мМ муравьиной кислоте в 60%-ном водном ацетонитриле (до концентрации 0.1 мМ и объема 10 мкл), анализ проводили в режиме регистрации положительно заряженных ионов.

**Гель-электрофорез.** Электрофоретический анализ в денатурирующих условиях проводили в 15%-ном ПААГ, содержавшем SDS (акриламид : N,N'-метиленабисакриламид (29 : 1), 5 М мочевины, 0.05% SDS), в буфере TBE-SDS (89 мМ Трис-борат, pH 8.3, 2 мМ Na<sub>2</sub>EDTA, 0.05% SDS) при напряжении 50 В/см. Для нанесения олигонуклео-

тидных образцов в гель использовали раствор, содержащий 5 М мочевины, 0.025%-ный ксиленианол и 0.025%-ный бромфеноловый синий, 0.05% SDS. Результаты электрофоретического разделения визуализировали, помещая гель на флуорофор-содержащую пластинку TLC Silica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck, США) и облучая УФ-светом (265 нм). Олигонуклеотидный материал проявляется в виде “теней” на фоне флуоресцирующей подложки.

## ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа по анализу механизма реализации анхимерного эффекта выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-34-90132) и является развитием пилотных исследований по масс-спектрометрическому анализу, проведенных при поддержке Российского научного фонда (грант № 18-14-00357) в 2019 г.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Glazier D.A., Liao J., Roberts B.L., Li X., Yang K., Stevens C.M., Tang W.* // *Bioconjugate Chem.* 2020. V. 31. P. 1213–1233. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.0c00060>
2. *Bennett C.F.* // *Annu. Rev. Med.* 2019. V. 70. P. 307–321. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-041217-010829>
3. *Eckstein F.* // *Nucleic Acid Ther.* 2014. V. 24. P. 374–387. <https://doi.org/10.1089/nat.2014.0506>
4. *Rettig G.R., Behlke M.A.* // *Mol. Ther.* 2012. V. 20. P. 483–512. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.263>
5. *Braasch D.A., Corey D.R.* // *Chem. Biol.* 2001. V. 8. P. 1–7. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(00\)00058-2](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(00)00058-2)
6. *Nielsen P.E.* // *Chem. Biodivers.* 2010. V. 7. P. 786–804. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201000005>
7. *Du L., Gatti R.A.* // *J. Immunol. Methods.* 2011. V. 365. P. 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2010.12.001>
8. *Kupryushkin M.S., Pyshnyi D.V., Stetsenko D.A.* // *Acta Naturae.* 2014. V. 6. P. 116–118.
9. *Dyudeeva E.S., Kupryushkin M.S., Lomzov A.A., Pyshnaya I.A., Pyshnyi D.V.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2019. V. 45. P. 709–718. <https://doi.org/10.1134/S1068162019060153>

10. *Pyshnaya I.A., Lomzov A.A., Pyshnyi D.V.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2019. V. 45. P. 677–683.  
<https://doi.org/10.1134/S1068162019060335>
11. *Kor K., Turner A., Zarei K., Atabati M., Beni V., Mak W.C.* // Anal. Bioanal. Chem. 2016. V. 408. P. 1475–1485.  
<https://doi.org/10.1007/s00216-015-9250-9>
12. *Bazhenov M.A., Shernyukov A.V., Kupryushkin M.S., Pyshnyi D.V.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2019. V. 45. P. 699–708.  
<https://doi.org/10.1134/S1068162019060074>
13. *Stetsenko D.A., Kupryushkin M.S., Pyshnyi D.V.* // Patent WO2016028187A1, 2016.
14. *Pavlova A.S., Dyudeeva E.S., Kupryushkin M.S., Amirkhanov N.V., Pyshnyi D.V., Pyshnaya I.A.* // Electrophoresis. 2018. V. 39. P. 670–674.  
<https://doi.org/10.1002/elps.201700415>
15. *Maiti M., Michielssens S., Dyubankova N., Maiti M., Lescrinier E., Ceulemans A., Herdewijn P.* // Chemistry. 2012. V. 18. P. 857–868.  
<https://doi.org/10.1002/chem.201102279>
16. *Kupryushkin M.S., Konevets D.A., Vasilyeva S.V., Kuznetsova A.S., Stetsenko D.A., Pyshnyi D.V.* // Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2013. V. 32. P. 306–319.  
<https://doi.org/10.1080/15257770.2013.787147>

## Problems of Synthesis of Oligonucleotide Derivatives in the Realization of Anchimeric Assistance

**E. S. Dyudeeva\*, A. S. Pavlova\*, M. S. Kupryushkin\*, D. V. Pyshnyi\*, \*\*, and I. A. Pyshnaya\*,#**

\*Phone: +7 (383) 363-51-35; e-mail: [pyshnaya@niboch.nsc.ru](mailto:pyshnaya@niboch.nsc.ru)

\*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, prosp. Acad. Lavrentieva 8, Novosibirsk, 630090 Russia

\*\*Novosibirsk State University, Department of Natural Sciences, ul. Pirogova 1, Novosibirsk, 630090 Russia

It was found that the presence of a free OH group on the 3'-terminal residue of the substituted ethylene glycol fragment in the phosphorylguanidine oligodeoxyribonucleotide is a factor that determines the instability of the structure of the target oligonucleotide product under the conditions of a standard deblocking protocol. It has been shown that the main by-products of the realization of such an anchimeric effect of the OH group are the products of the transesterification reaction of the phosphorylguanidine (PG) unit carrying the *O*-substituted ethylene glycol residue. Mass-spectrometric analysis data show that under alkaline conditions, there is an accumulation of derivatives lacking the *N,N,N',N'*-substituted guanidine residue (1,3-dimethylimidazolidine-2-imine or DMI), or only 3'-terminal PG-containing non-nucleotide unit.

*Keywords: modified oligonucleotides, phosphorylguanidines, mass spectrometry, anchimeric effect*