



ПОЛУЧЕНИЕ НОВЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ КЛАССА ФОСФОРИЛГУАНИДИНОВЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

© 2021 г. С. А. Жуков*, Д. В. Пышный*, **, М. С. Купрюшкин*, #

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

**ФГБОУ ВПО “Новосибирский национальный исследовательский государственный университет”,
Россия, 630090 Новосибирск, ул. Пирогова, 2

Поступила в редакцию 24.09.2020 г.

После доработки 30.09.2020 г.

Принята к публикации 10.10.2020 г.

В данной работе были получены новые представители класса фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидных производных. Предложена и осуществлена синтетическая схема, позволяющая получать из различных вторичных аминов широкий набор диаминокарбенийазидов для последующего введения тетразамещенных гуанидиновых остатков в состав олигонуклеотидов по реакции Штаудингера. Был выявлен ряд факторов, влияющих на выход фосфорилгуанидинового производного, таких как размер алкильных заместителей в составе используемого азиды и его чистота, а также проведение процедуры элиминирования защитной цианэтильной группы, предшествующей финальному деблокированию олигонуклеотида.

Ключевые слова: автоматизированный синтез олигонуклеотидов, модифицированные олигонуклеотиды, органические азиды, реакция Штаудингера, фосфорилгуанидины, фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды (ФГО)

DOI: 10.31857/S0132342321020299

ВВЕДЕНИЕ

Синтетические олигонуклеотиды в настоящее время нашли широкое применение в различных областях молекулярной биологии, биотехнологии и медицины. На данный момент более 10 олигонуклеотидных препаратов уже одобрены организацией FDA (Food and Drug Administration), а более 40 препаратов находятся на различных стадиях клинических испытаний [1–3]. Для терапевтического применения олигонуклеотидов особое значение имеют такие свойства, как химическая и энзиматическая устойчивость, эффективность проникновения в клетки и биораспределение, которые достигаются введением различных модификаций в состав создаваемых НК-конструкций [4].

Существует множество путей введения химических модификаций в структуру олигонуклеотидов [5, 6], при этом реализация большинства из них зачастую является отдельной синтетической

задачей. Разработка подходов, позволяющих унифицировать процедуру введения различных модификаций и их комбинаций в состав олигонуклеотида, является актуальным технологическим этапом, а применение способов, совместимых с протоколами твердофазного амидофосфитного синтеза, позволяет сделать создание различных олигонуклеотидных конструкций рутинной процедурой.

В Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН был разработан новый класс НК-производных – фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды [7]. Для их получения использовали окисление фосфиттриэфирной группы (промежуточного продукта олигонуклеотидного синтеза) тетразамещенным диаминокарбенийазидом по реакции Штаудингера. В настоящее время эффективность данного подхода продемонстрирована на примере коммерчески доступного диаминокарбенийазиды – гексафторфосфата 2-азидо-1,3-диметилимидазолидиния (ADMP) [8]. Новый класс соединений и метод их получения в настоящий момент запатентованы в России и Японии и находится на стадии патентования в национальных ведомствах других стран [9].

Данный подход позволяет вводить замещенные гуанидиновые остатки по межнуклеотидному фос-

Сокращения: ADMP – гексафторфосфат 2-азидо-1,3-диметилимидазолидиния; CPG – стекло с контролируемым размером пор (controlled pore glass); DIPEA – *N,N*-диизопропилэтиламин; НК – нуклеиновая кислота; офВЭЖХ – обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография.

Автор для связи: (тел.: +7 (923) 243-26-23; эл. почта: kuprumax@gmail.com; pyshnyi@niboch.nsc.ru).

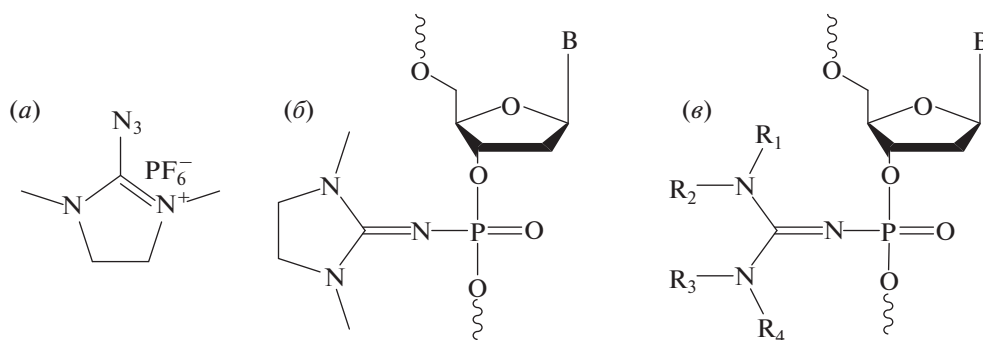


Рис. 1. (а) – Гексафторфосфат 2-азидо-1,3-диметилимидазолидиния (ADMP) – единственный коммерчески доступный диаминокарбенийазид; (б) – фосфорилгуанидиновое производное олигонуклеотида с 1,3-диметилимидазолидиновой группой; (е) – фосфорилгуанидиновое производное олигонуклеотида с различными заместителями R₁–R₄.

фату олигонуклеотидной цепи с высокой эффективностью, даже в случае получения олигонуклеотидов с полностью модифицированным остовом. Реакция не требует применения высококонцентрированных растворов и нагревания, что позволило адаптировать метод введения данной модификации к автоматическому синтезу олигонуклеотидов на ДНК/РНК-синтезаторах.

Данная статья посвящена разработке схемы синтеза различных тетразамещенных диаминокарбенийазидов и получения новых представителей класса фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов по реакции Штаудингера.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение тетразамещенных диаминокарбенийазидов. В настоящее время единственным коммерчески доступным диаминокарбенийазидом является ADMP (рис. 1а), используемый для введения 1,3-диметилимидазолидиновой группы в состав олигонуклеотидного остова (рис. 1б). Для получения фосфорилгуанидиновых производных с другими заместителями (рис. 1е) необходимо разработать схему синтеза соответствующих диаминокарбенийазидов.

Для синтеза набора азидов-модификаторов, несущих различные заместители, была выбрана схема, включающая следующие этапы: получение замещенной мочевины, конвертацию мочевины в соответствующий диаминокарбенийхлорид и замещение атома хлора на азидогруппу.

Учитывая трудоемкость получения несимметричных замещенных мочевины, было решено использовать различные вторичные амины как исходные соединения, содержащие различные функциональные остатки. В качестве карбонилирующего агента был выбран тиофосген (рис. 2, стадия (1)). Далее взаимодействием с оксалилхлоридом тиомочевинны конвертировали в диаминокарбенийхлориды (рис. 2. стадия (2)), так называемые соли

Вильсмайера [10]. Для получения диаминокарбенийазидов действием азидата натрия замещали атом хлора на азидогруппу (рис. 2, стадия (3)) [11].

В качестве исходных соединений для получения целевых азидов были выбраны вторичные амины с алкильными заместителями различной длины (рис. 3, (IIIa–VIa)), а также тетраметилмочевина (рис. 3, (Ib)) и коммерчески доступная соль Вильсмайера (рис. 3, (IIc)) для синтеза азидов по сокращенной схеме. На первой стадии синтеза взаимодействием тиофосгена с избытком вторичного амина получали симметричные тетразамещенные тиомочевинны (IIIb–VIb). Для связывания образующегося HCl в реакционную смесь добавляли *N,N*-диизопропилэтиламин (DIPEA) либо, если образующаяся соль используемого амина (Va) и (VIa) выпадала в осадок, вносили дополнительное количество такого амина. Получаемые тиомочевинны отделяли от избытка амина и побочных продуктов методом колоночной хроматографии. Полноту протекания реакций и чистоту образующихся продуктов контролировали при помощи анализа методами ТСХ и ¹H-ЯМР.

На следующей стадии взаимодействием тиомочевин с оксалилхлоридом получали диаминокарбенийхлориды, так называемые соли Вильсмайера. В ходе реакции образуются газообразные CO и CSO, что позволяет избежать необходимости очистки целевого продукта от продуктов деградации используемого реагента. Кроме того, оксалилхлорид обладает достаточно низкой температурой кипения (61 °C), что позволяет отделять его избыток от реакционной смеси при упаривании. В данной реакции образуется соль Вильсмайера с анионом Cl⁻, но для повышения растворимости конечного продукта в органических растворителях противоион замещали на гексафторфосфат в реакции обмена с солью KPF₆ [12], после чего отделяли реакционную смесь от осадка хлорида калия фильтрованием.

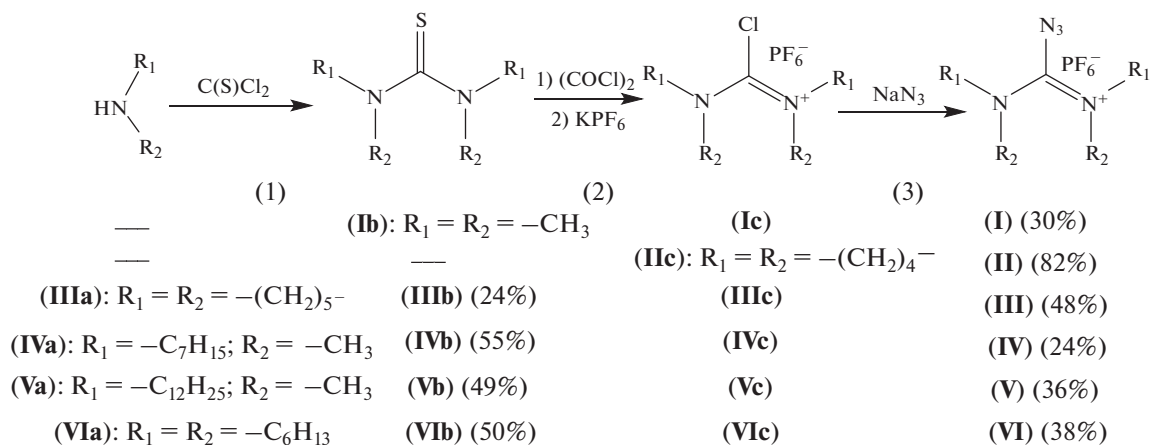


Рис. 2. Схема получения диаминокарбонийазидов: (1) – получение тиомочевины; (2) – получение соли Вильсмайера; (3) – замещение атома хлора на азидогруппу.

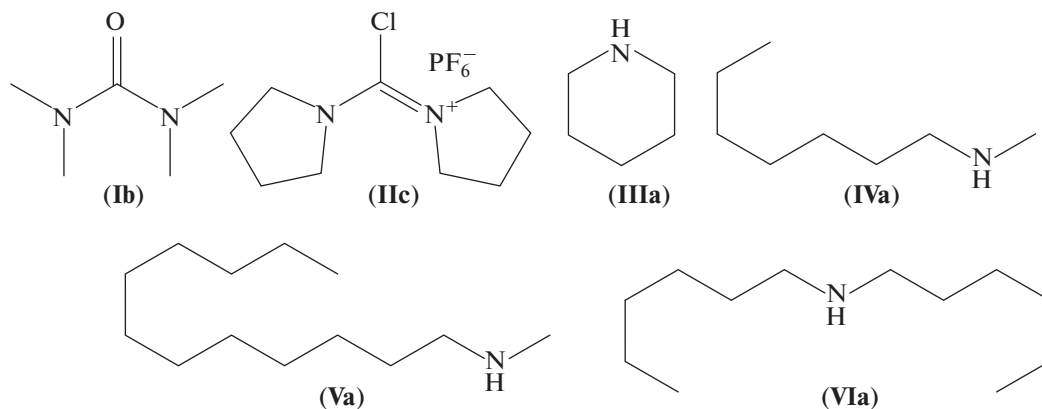


Рис. 3. Соединения-предшественники для получения диаминокарбонийазидов: тетраметилмочевина (Ib); гексафторфосфат хлоридопирролидинокарбония (IIc); амины: пиперидин (IIIa), *N*-гептилметиламин (IVa), *N*-додецилметиламин (Va), дигексилламин (VIa).

Поскольку соли Вильсмайера обладают крайне высокой реакционной способностью, данные соединения не выделяли, и после фильтрования и упаривания получаемую реакционную смесь вводили в реакцию с азидом натрия для замещения атома хлора на азидогруппу. Азид натрия мало растворим в органических растворителях, поэтому для проведения реакции использовали суспензию азидата натрия в ацетонитриле. Анализ ¹H-ЯМР-спектров полученных азидов показал, что сигналы, соответствующие примесям непрореагировавших веществ и возможным продуктам их деградации, составляют не более 10% от суммарной интенсивности. Таким образом, реакции получения соли Вильсмайера и замещения атома хлора на азидогруппу протекают с высокой эффективностью.

С использованием разработанной синтетической схемы был получен набор из шести азидо-модификаторов (рис. 4).

Использование синтезированных азидов для введения модификаций в состав олигонуклеотидов. Для проверки эффективности протекания реакции Штаудингера с использованием полученных азидо-модификаторов были синтезированы модельные октатимидилаты 5'-T*TTTTTT-3' (рис. 5). После этапа присоединения мономера стадии окисления не проводили, автоматический синтез останавливали, реактор вынимали из синтезатора, полимерный носитель (CPG) с иммобилизованным фосфиттриэфиром переносили из реактора в пластиковую пробирку и проводили реакцию Штаудингера с раствором диаминокарбонийазидов. Затем переносили носитель в реактор для синтеза олигонуклеотидов, после чего продолжали обработки в рамках автоматизированного твердофазного синтеза.

Эффективность введения модификации (конверсию) оценивали по профилю оФВЭЖХ как отношение площади пика, соответствующего моди-

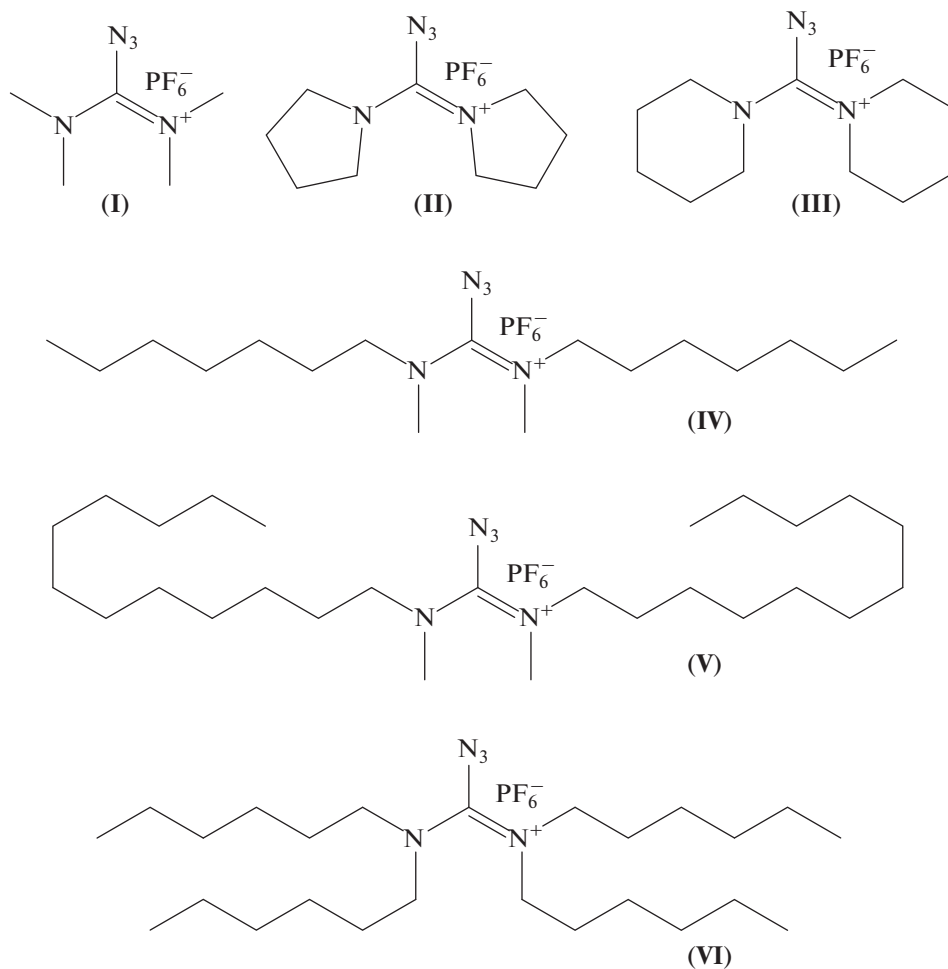


Рис. 4. Библиотека синтезированных диаминокарбенийазидов.

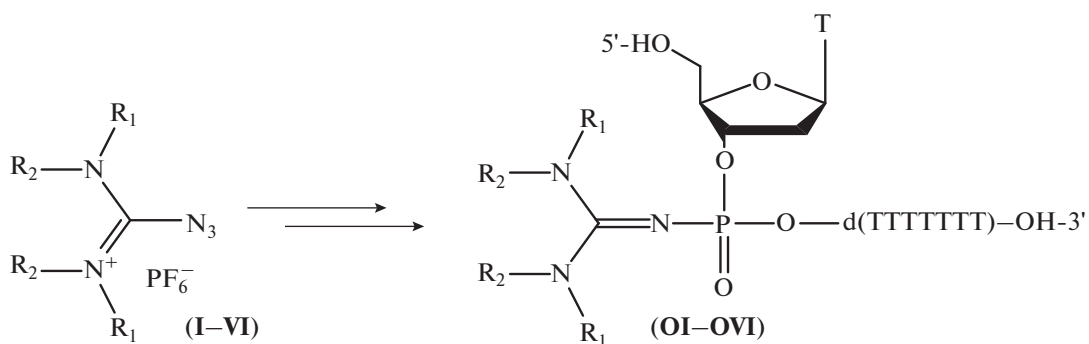


Рис. 5. Схема введения модификации в состав модельного октатимидилата 5'-T*TTTTTTT-3' по реакции Штаудингера. (I) R₁ = R₂ = -CH₃; (II) R₁ = R₂ = -(CH₂)₄-; (III) R₁ = R₂ = -(CH₂)₄-; (IV) R₁ = -C₇H₁₅, R₂ = -CH₃; (V) R₁ = -C₁₂H₂₅, R₂ = -CH₃; (VI) R₁ = R₂ = -C₆H₁₃.

фицированному олигонуклеотиду, к суммарной площади пиков на хроматограмме. Для обеспечения введения модификации с эффективностью не менее 50% при проведении реакции Штаудингера в большинстве случаев использовали концен-

трированные 1 М растворы азидов-модификаторов в ацетонитриле при умеренном нагревании (40°C). Условия, значения конверсии введения модификаций, а также результаты масс-спектрометрии полученных представителей класса

Таблица 1. Эффективность введения различных модификаций олигонуклеотида 5'-Т*ТТТТТТТТ-3' (* – место введения модификации по межнуклеотидному фосфату) и результаты масс-спектрометрического анализа модифицированных олигонуклеотидов

Шифр азида	Шифр олигонуклеотида	Условия	Конверсия, %	$M_{Г(теор)}$, г/моль	$M_{Г(эксп)}$, г/моль
(I)	(OI)	1 М, 40°C, 1 ч	~80	2467.5	2467.5
(II)	(OII)	0.25 М, 40°C, 1 ч	~90	2519.5	2519.4
(III)	(OIII)	1 М, 40°C, 1 ч	~70	2547.6	2547.6
(IV)	(OIV)	1 М, 40°C, 1 ч	~60	2635.8	2635.7
(V)	(OV)	1 М, 50°C, 6 ч	~50	2775.9	2775.8
(VI)	(OVI)	1 М, 40°C, 1 ч	0	–	–
ADMP	(OVII)	0.1 М, 40°C, 1 ч	~90	2465.4	2465.5
–	T8	–	–	2370.4	2370.4

Примечание: для олигонуклеотида (OVI) не приведены значения массы, т.к. масс-спектр не регистрировали.

фосфорилгуанидинов представлены в табл. 1. Кроме того, в табл. 1 приведено значение конверсии при использовании коммерчески доступного азида ADMP, получаемое при введении модификации в ручном режиме по описанному выше протоколу. Стоит отметить, что при проведении реакции с ADMP в автоматическом режиме синтеза значения конверсии превышают 99% [8].

Анализируя значения конверсии, можно выявить закономерность: эффективность введения модификации падает с нарастанием размера алкильных заместителей, что можно объяснить стерическими затруднениями при взаимодействии азида с фосфиттриэфирной группой в составе растущей олигонуклеотидной цепи. В случае азида (VI), содержащего четыре гексильных заместителя, реакция Штаудингера не протекает вовсе (конверсия 0%). Для азида (V), содержащего две метильные и две объемные додецильные группы, при проведении реакции в течение 1 ч при 40°C наблюдалось низкое значение конверсии (10%), и только при повышении температуры до 50°C и существенном увеличении времени (6 ч) эффективность введения модификации увеличилась до 50%. В то же время для азида (II), содержащего компактные циклические заместители, высокое значение конверсии (~90%) было достигнуто при 40°C и более низкой концентрации азидопроизводного (0.25 М).

На рис. 6а представлены профили оФВЭЖХ реакционных смесей полученных модифицированных олигонуклеотидов. Пик со временем удерживания 6.8 мин соответствует немодифицированному олигонуклеотиду (градиент ацетонитрила 0–50% за 15 мин). Более гидрофобные фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды имеют большее время удерживания, увеличивающееся с нарастанием размера алкильных заместителей. Для анализа наиболее гидрофобного производного (OV), содержащего додецильные остатки, был использован градиент ацетонитрила 0–90% (рис. 6б).

Несимметричность (OI, OIV, OV) или раздвоенность (OII, OIII) пиков, соответствующих целевым продуктам синтеза, обусловлена существованием двух диастереомерных форм мономодифицированных олигонуклеотидов, имеющих различное время удерживания.

Кроме того, был проведен эксперимент по исследованию электрофоретической подвижности синтезированных олигонуклеотидов в условиях денатурирующего ПААГ-электрофореза (рис. 7). Меньшая электрофоретическая подвижность модифицированных олигонуклеотидов в сравнении с нативным олигонуклеотидом равной длины объясняется наличием в них незаряженной фосфорилгуанидиновой группы. Снижение суммарного заряда олигонуклеотида при сохранении его длины приводит к уменьшению электрофоретической подвижности. С нарастанием размеров алкильных заместителей подвижность уменьшается незначительно.

Влияние предварительного элиминирования цианэтильной группы на эффективность конверсии реакции модификации олигонуклеотидов. В первоначально проведенных экспериментах по введению модификации на примере азида (II) даже в сравнительно жестких условиях (1 М, 40°C, 1 ч) значения конверсии не превышали 50%, а в качестве единственного побочного продукта присутствовал соответствующий немодифицированный олигонуклеотид (рис. 8, кривая 1).

При этом в случае использования азида (VI), когда обнаружить целевой продукт не удавалось вовсе, на хроматографическом профиле реакционной смеси можно отчетливо наблюдать два пика, соответствующих продуктам деградации неокисленного фосфиттриэфирного производного. Такой же профиль хроматографии наблюдался в случае контрольного эксперимента, в котором при синтезе октатимидилата последнее звено вводили без проведения стадии окисления (рис. 8, кривая 2). Данное наблюдение позволило предположить,

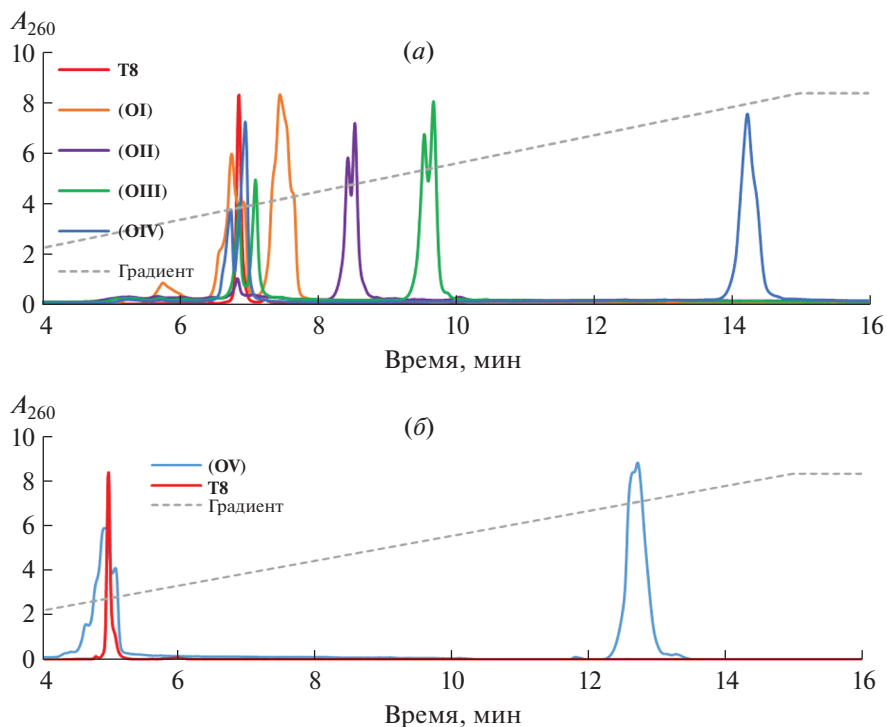


Рис. 6. (а) – Профили офВЭЖХ олигонуклеотидов (OI–OIV). Градиент ацетонитрила 0–50% за 15 мин; (б) – профиль офВЭЖХ олигонуклеотида (OV). Градиент ацетонитрила 0–90% за 15 мин. T8 – контрольный октагидримидилат.

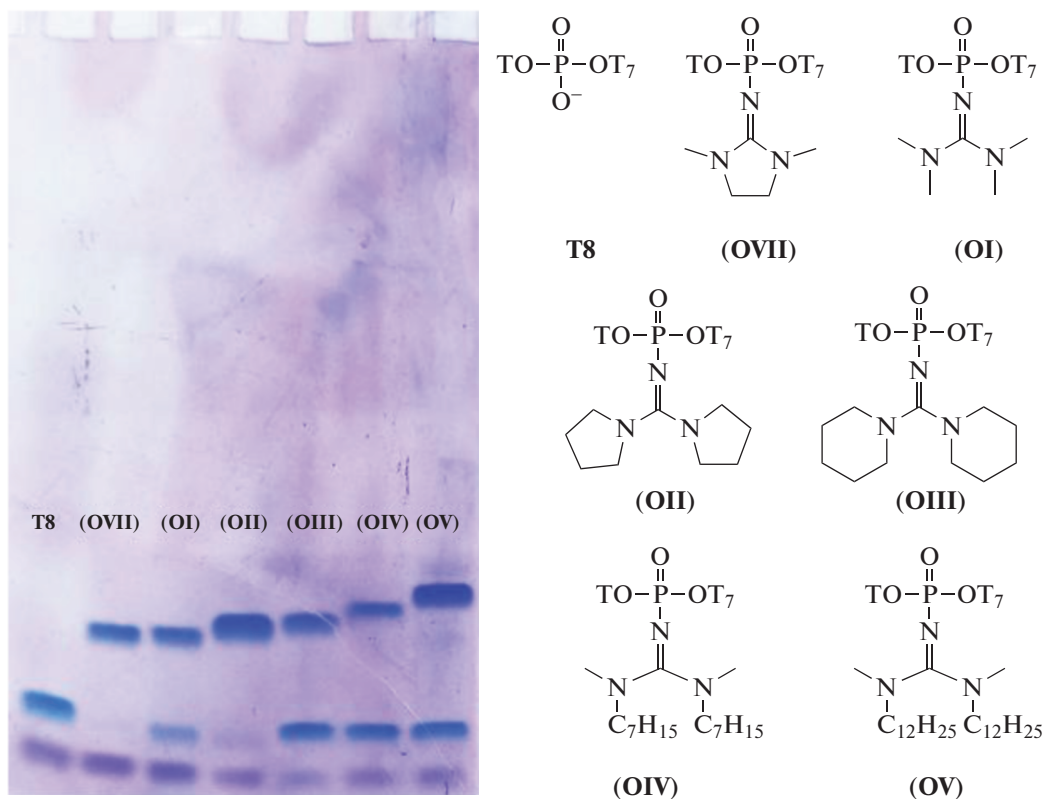


Рис. 7. Подвижность модифицированных олигонуклеотидов (OI–OV) и (OVII), а также контрольного немодифицированного олигонуклеотида (T8) в условиях денатурирующего электрофореза в 15%-ном ПААГ.

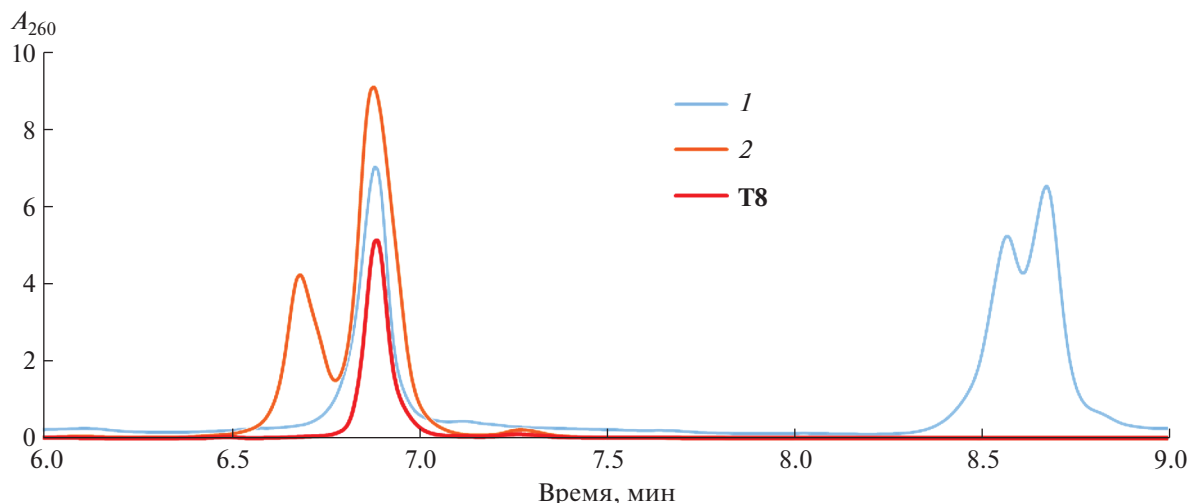


Рис. 8. Профили офВЭЖХ олигонуклеотидов: 1 – введение модификации с использованием азида (II) без предварительного элиминирования (5'-T*TTTTTTT-3'); 2 – контрольный эксперимент, последний мономер присоединили без стадии окисления (5'-T*TTTTTTT-3'). T8 – контрольный октадимидаат. Градиент ацетонитрила 0–50% за 15 мин.

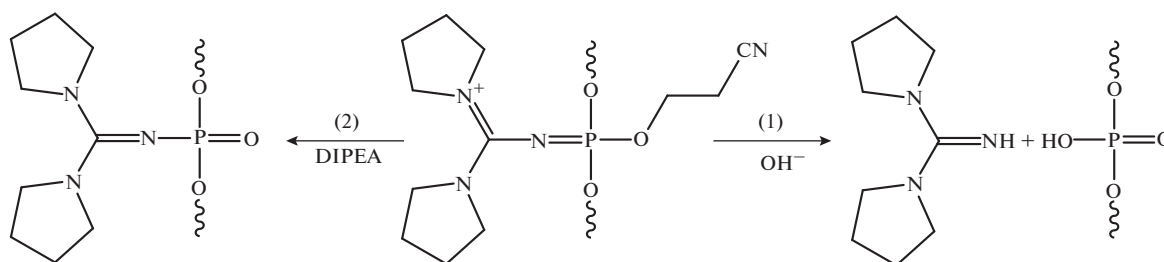


Рис. 9. Возможные пути превращения промежуточного фосфазенового продукта: (1) – побочная реакция в ходе пост-синтетической обработки, приводящая к образованию нативного олигонуклеотида; (2) – элиминирование цианэтильной группы действием DIPEA.

что низкие значения конверсии реакции модификации азидом (II) объясняются не низкой реакционной способностью используемого азида, а щелочным гидролизом получающегося фосфазенового производного (промежуточного продукта реакции Штаудингера) при финальном деблокировании синтезируемого олигонуклеотида водным раствором аммиака или метиламина (рис. 9, (1)).

Для предотвращения протекания данной побочной реакции в протокол синтеза модифицированной олигонуклеотидной цепи после проведения реакции Штаудингера был введен этап обработки 10%-ным раствором DIPEA в ацетонитриле в течение 20 мин при 40°C для элиминирования защитной цианэтильной группы, что приводило к превращению фосфазенового остатка в стабильный фосфорилгуанидин еще до проведения финального деблокирования олигонуклеотида [13] (рис. 9, (2)).

Предварительное элиминирование цианэтильной группы привело к увеличению конверсии до значений >90%. В дальнейшем при введении всех

модификаций использовали обработку 10%-ным раствором DIPEA в ацетонитриле. Значения конверсии, представленные в табл. 1, соответствуют экспериментам, проведенным с предварительным элиминированием цианэтильной группы до финального деблокирования олигонуклеотидного производного.

Еще одним наблюдением является увеличение выхода целевого продукта при синтезе олигонуклеотида с модификацией межнуклеотидного звена, отличного от 5'-терминальной позиции, даже без этапа обработки раствором DIPEA. Так, для олигонуклеотида 5'-TT*TTTTTTT-3' конверсия составила 70%. Данное наблюдение однозначно указывает на возможность протекания процесса элиминирования цианэтильной группы в составе фосфазенового остатка при прохождении полного синтетического цикла по стандартному амидо-фосфитному протоколу.

При синтезе модельного олигонуклеотида 5'-T*TTTTTTT-3' по протоколу с двукратно увеличенным этапом кэпирования, следующим сра-

зу после этапа реакции Штаудингера, конверсия возросла до 90%. Вероятно, раствор *N*-метилимидазола в пиридине, обработка которым является частью протокола кэпирования, способен обеспечивать элиминирование цианэтильной группы при атоме фосфора в составе фосфазенового производного, чего не наблюдается в случае менее реакционноспособного “немодифицированного” фосфиттриэфирного звена растущей цепи.

Таким образом, при синтезе фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов возможно проводить необходимый этап элиминирования защитной группы в автоматическом режиме, используя растворы и реagenты, применяемые в стандартном амидофосфитном протоколе олигонуклеотидного синтеза.

Интересно отметить, что для различных азидов степень влияния предварительного этапа β -элиминирования на значение конверсии различна. Так, при использовании азида ADMP значения конверсии синтеза олигонуклеотида 5'-T*TTTTTTT-3' с этапом β -элиминирования и при его отсутствии составляют 90 и 60% соответственно. Вероятно, алкильные заместители при гуанидиновом остатке в составе получаемого фосфазенового производного способны влиять на распределение между продуктами щелочного гидролиза при финальном деблокировании синтезируемого олигонуклеотида.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты и растворители. В работе были использованы следующие реагенты и растворители: гексафторфосфат калия, дигексиламин, *N*-гептилметиламин, *N*-додецилметиламин, пиперидин, гексафторфосфат хлородипирролидинокарбения (Sigma Aldrich, США); ацетонитрил, азид натрия, триэтиламин, диизопропилэтиламин (Panreac, Испания); гексафторфосфат 2-азидо-1,3-диметилимидазолидиния, оксалилхлорид (TCI, Япония); дихлорметан, водный раствор аммиака, этиловый спирт, толуол (Реаким, Россия); тиофосген (Fluka, Швейцария); тетраметилмочевина (Merck, Германия).

Для ТСХ использовали пластинки DC-Alufolien Kieselgel 60 F254 (Merck, Германия), для колоночной адсорбционной хроматографии — колонку объемом 200 мл, заполненную рассчитанным количеством сорбента Kieselgel 60 (размер частиц 0.060–0.200 мм, размер пор 60 Å; Merck, Германия).

Для упаривания водных растворов использовали вакуумный концентратор SpeedVac (ThermoFisher, США), для упаривания органических растворов — Rotavapor R200 (Buchi, Швейцария). Получаемые соединения высушивали в эксикаторе до постоянной массы.

Хроматографический анализ. Полученные олигонуклеотиды анализировали методом офВЭЖХ

на хроматографе Милихром А02 с использованием колонки ProntoSIL-120-5-C18, 2 × 75 мм (Эконова, Россия). Анализ проводили в системе “0.02 М ацетат триэтиламония — 90%-ный ацетонитрил”, градиент ацетонитрила 0–90% за 30 мин, поток 200 мкл/мин, температура термостата 35°C. Детекцию осуществляли при длине волны 260 нм.

Электрофорез проводили в 15%-ном ПААГ в денатурирующих условиях (акриламид : *N,N'*-метиленбисакриламид (30 : 1), 8 М мочевины, 89 мМ Трис-борат, рН 8.3, 2 мМ Na₂-EDTA) в буферном растворе ТВЕ (89 мМ Трис-борат, рН 8.3, 2 мМ Na₂-EDTA) при напряжении 50 В/см. Олигонуклеотидные образцы наносили на гель в растворе 8 М мочевины, содержащем 0.05% ксиленицианола FF и 0.05% бромфенолового синего. Результаты электрофоретического разделения визуализировали при помощи красителя Stains-all.

Спектры ¹H-ЯМР регистрировали на спектрометре Spinsolve 80 (Magritek, Германия; 80 МГц).

Масс-спектрометрия. Молекулярные массы олигонуклеотидов и олигонуклеотидных аналогов определяли с помощью масс-спектрометрии (ионизация методом электрораспыления) на приборе G6410A LCMS/MS (Agilent, США). Образцы олигонуклеотидов готовили растворением в 20 мМ триэтиламоний ацетате в 60%-ном водном ацетонитриле до концентрации 0.1 мМ и объема 10 мкл. Для анализа использовали 80%-ный водный ацетонитрил в качестве элюента при скорости потока 0.1 мл/мин в режиме регистрации отрицательных заряженных ионов.

Все реакции проводили без доступа воздуха в атмосфере аргона. Абсолютирование органических растворителей проводили стандартными методами с последующим выдерживанием над молекулярными ситами или гидридом кальция.

Синтез олигонуклеотидов осуществляли на автоматическом ДНК-синтезаторе ASM-800 (Biosset, Россия) согласно стандартному протоколу твердофазного амидофосфитного синтеза, используя коммерческие дезоксирибонуклеозидные мономеры и соответствующие пористые стекла (Glen Research, США).

Для получения олигонуклеотидов, содержащих модифицированные звенья, присоединение соответствующего мономера проводили без стадий кэпирования, окисления и деблокирования. Затем реактор вынимали из синтезатора, полимерный носитель (CPG) с иммобилизованным промежуточным продуктом переносили из реактора в пластиковую пробирку и обрабатывали раствором азидо-модификатора, после чего обрабатывали промежуточный продукт 10%-ным раствором *N,N*-диизопропилэтиламина в ацетонитриле в течение 20 мин при 40°C. Далее переносили CPG в реактор, и все последующие обработки прово-

дили в условиях автоматического твердофазного синтеза.

Органический синтез. Бис(пентаметилен)тио-мочевина (IIIb). К раствору пиперидина (1.3 мл, 12.7 ммоль) в 6 мл ацетонитрила при перемешивании добавляли тиофосген (250 мкл, 3.1 ммоль). Реакцию проводили при комнатной температуре. Через 3 ч отделяли образовавшийся осадок фильтрованием на бумажном фильтре, фильтрат упаривали на ротационном испарителе, 2 раза соупаривали с 6 мл толуола при 45°C, затем упаривали реакционную смесь в течение 1 ч при 60°C для удаления избытка пиперидина. После высушивания в эксикаторе было получено 158 мг продукта в виде желто-оранжевого масла (выход 24%).

^1H -ЯМР (80 МГц, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ , м.д.): 1.54 (m, 12H, $\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 3.40 (m, 8H, $\text{N}-\text{CH}_2-$).

***N,N'*-дигептил-*N,N'*-диметилтио-мочевина (IVb).** К раствору *N*-гептилбутиламина (550 мкл, 3.2 ммоль) в 6 мл ацетонитрила при перемешивании добавляли *N*-диизопропилэтиламин (550 мкл, 3.2 ммоль) и тиофосген (125 мкл, 1.5 ммоль). Реакцию проводили при комнатной температуре. Через 4 ч реакционную смесь упаривали на ротационном испарителе. Очистку проводили методом колоночной хроматографии в системе 20%-ный этанол в толуоле с добавлением 1% триэтиламина. Объединенные фракции упаривали на ротационном испарителе. После высушивания в эксикаторе было получено 180 мг продукта в виде желтого масла (выход 55%).

***N,N'*-дидодецил-*N,N'*-диметилтио-мочевина (Vb).** К раствору *N*-додецилметиламина (1630 мкл, 3.2 ммоль) в смеси 4 мл гексана и 2 мл ацетонитрила при перемешивании добавляли тиофосген (125 мкл, 1.5 ммоль). Реакцию проводили при температуре 60°C. Через 20 ч реакционную смесь упаривали на ротационном испарителе. Очистку проводили методом колоночной хроматографии в дихлорметане с добавлением 1% триэтиламина. Объединенные фракции упаривали на ротационном испарителе. После высушивания в эксикаторе было получено 333 мг продукта в виде желтых кристаллов (выход 49%).

^1H -ЯМР (80 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 0.87 (t, 6H, $-\text{N}-(\text{CH}_2)_{11}-\text{CH}_3$), 1.25 (m, 40H, $-\text{N}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CH}_3$), 2.99 (s, 6H, $\text{N}-\text{CH}_3$), 3.51 (t, 4H, $-\text{N}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CH}_3$).

Тетрагексилтио-мочевина (VIb). К раствору тетрагексиламина (3 мл, 12.7 ммоль) в смеси 4 мл гексана и 2 мл ацетонитрила при перемешивании добавляли тиофосген (250 мкл, 3.1 ммоль). Реакцию проводили при температуре 60°C. Через 20 ч реакционную смесь упаривали на ротационном испарителе. Очистку проводили методом колоночной хроматографии в системе 2%-ный этилацетат в гексане с добавлением 1% триэтиламина.

Объединенные фракции упаривали на ротационном испарителе. После высушивания в эксикаторе было получено 637 мг продукта в виде желтых кристаллов (выход 50%).

^1H -ЯМР (80 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 0.87 (t, 12H, $-\text{N}-(\text{CH}_2)_5-\text{CH}_3$), 1.26 (m, 32H, $-\text{N}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}_3$), 3.45 (t, 8H, $-\text{N}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}_3$).

Общая методика получения солей Вильсмайера и диаминокарбенийазидов (I, III–VI). К раствору соответствующей тио-мочевины или мочевины в 6 мл ацетонитрила (или дихлорметана для тио-мочевин (Vb, VIb)) при перемешивании по каплям добавляли оксалихлорид (3 экв.). Реакцию проводили при комнатной температуре. Через 15 мин после завершения выделения газа добавляли твердый гексафторфосфат калия (1.1 экв.). Через 4 ч фильтровали реакционную смесь на бумажном фильтре, фильтрат упаривали на ротационном испарителе для удаления избытка оксалихлорида, растворяли в 6 мл ацетонитрила и при перемешивании добавляли твердый азид натрия (5 экв.). Через 20 ч реакционную смесь фильтровали на бумажном фильтре и упаривали на ротационном испарителе. После высушивания в эксикаторе получали соответствующий азид в виде желтого или коричневого масла.

Гексафторфосфат азидо-*N,N,N',N'*-тетраметилформамидиния (I). Получено 172 мг продукта (выход 30%). ^1H -ЯМР (80 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 2.80 (s, 12H, $-\text{CH}_3$).

Гексафторфосфат азидодиперидинокарбения (III). Получено 73 мг продукта (выход 48%). ^1H -ЯМР (80 МГц, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ , м.д.): 1.58 (m, 12H, $\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 3.25 (m, 8H, $\text{N}-\text{CH}_2-$).

Гексафторфосфат азидо-*N,N'*-дигептил-*N,N'*-диметилформамидиния (IV). Получено 65 мг продукта (выход 24%). ^1H -ЯМР (80 МГц, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ , м.д.): 0.85 (t, 6H, $\text{N}-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}_3$), 1.24 (m, 20H, $\text{N}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_5$), 2.85 (s, 6H, $\text{N}-\text{CH}_3$), 3.07 (t, 4H, $\text{N}-\text{CH}_2-$).

Гексафторфосфат азидо-*N,N'*-дидодецил-*N,N'*-диметилформамидиния (V). Получено 162 мг продукта (выход 36%). ^1H -ЯМР (80 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 0.87 (t, 6H, $-\text{N}-(\text{CH}_2)_{11}-\text{CH}_3$), 1.25 (m, 40H, $-\text{N}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CH}_3$), 2.85 (s, 6H, $\text{N}-\text{CH}_3$), 3.45 (t, 4H, $-\text{N}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CH}_3$).

Гексафторфосфат азидо-*N,N,N',N'*-тетрагексилформамидиния (VI). Получено 337 мг продукта (выход 38%). ^1H -ЯМР (80 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 0.87 (t, 12H, $-\text{N}-(\text{CH}_2)_5-\text{CH}_3$), 1.26 (m, 32H, $-\text{N}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}_3$), 3.35 (t, 8H, $-\text{N}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}_3$).

Гексафторфосфат азидодипирролидинокарбения (II). К раствору гексафторфосфата хлоридипирролидинокарбения (350 мг, 1 ммоль) в 6 мл сухого ацетонитрила добавляли твердый азид на-

трия (260 мг, 5 ммоль). Реакцию проводили при комнатной температуре. Через 2 ч реакционную смесь фильтровали на бумажном фильтре, фильтрат упаривали на ротационном испарителе. После высушивания в эксикаторе было получено 280 мг продукта в виде белых кристаллов (выход 82%).

^1H -ЯМР (80 МГц, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ , м.д.): 1.91 (m, 8H, N-CH₂-CH₂-), 3.67 (m, 8H, N-CH₂-).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе была предложена синтетическая схема, позволяющая получить широкий набор тетразамещенных диаминокарбенилазидов из вторичных аминов. В случае использования коммерчески доступных мочевины или солей Вильсмайера схема синтеза может быть сокращена, однако в каталогах можно найти лишь ограниченное количество таких реагентов, тогда как широкий набор доступных вторичных аминов позволяет получать большое количество различных азидов.

С использованием данной схемы был синтезирован набор азидов-модификаторов, содержащих алкильные заместители различной длины, которые были использованы для введения модификаций в состав олигонуклеотидов по реакции Штаудингера. Было показано, что эффективность введения модификации падает с увеличением размера алкильных заместителей. Высокие значения конверсии в случае коммерческого азида ADMP, а также азида (II), полученного в одну стадию из соли Вильсмайера, свидетельствуют о существенном влиянии даже незначительного количества примесей в используемом азиде на эффективность протекания реакции.

Предварительное элиминирование цианэтильной группы в безводных условиях позволяет существенно увеличить эффективность введения модификации за счет превращения фосфазенового остатка в стабильный фосфорилгуанидин до финального деблокирования олигонуклеотида водным раствором аммиака.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Объединенному центру коллективного пользования Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН за проведение масс-спектрометрического анализа олигонуклеотидов и м.н.с. лаборатории биомедицинской химии Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН А.С. Чубарову за регистрацию спектров ЯМР.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке базового бюджетного финансирования Программы фун-

даментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы № АААА-А17-117020210024-8.

М.С. Купрюшкин выражает благодарность Российскому научному фонду (проект № 19-14-00204) за поддержку синтеза и характеристики нативных и модифицированных олигонуклеотидов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

М.С. Купрюшкин и Д.В. Пышный являются соучредителями ООО “НooГен” — компании, занимающейся разработкой технологии получения фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов и их применения.

С.А. Жуков заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yin W., Rogge M. // *Cts-Clin. Transl. Sci.* 2019. V. 12. P. 98–112. <https://doi.org/10.1111/cts.12624>
2. Heo Y.A. // *Drugs.* 2020. V. 80. P. 329–333. <https://doi.org/10.1007/s40265-020-01267-2>
3. Balwani M., Sardh E., Ventura P., Peiro P.A., Rees D.C., Stolzel U., Bissell D.M., Bonkovsky H.L., Windyga J., Anderso, K.E., Parker C., Silver S.M., Keel S.B., Wang J.D., Stein P.E., Harper P., Vassiliou D., Wang B., Phillips J., Ivanova A., Langendonk J.G., Kauppinen R., Minder E., Horie Y., Penz C., Chen J.H., Liu S.B., Ko J.J., Sweetser M.T., Garg P., Vaishnav A., Kim J.B., Simon A.R., Gouya L., Investigators E. // *New Engl. J. Med.* 2020. V. 382. P. 2289–2301. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1913147>
4. Rinaldi C., Wood M.J.A. // *Nat. Rev. Neurol.* 2018. V. 14. P. 9–21. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.148>
5. Deleavey G.F., Damha M.J. // *Chem. Biol.* 2012. V. 19. P. 937–954. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.07.011>
6. Roy S., Caruthers M. // *Molecules.* 2013. V. 18. P. 14268–14284. <https://doi.org/10.3390/molecules18114268>
7. Kupryushkin M.S., Pyshnyi D.V., Stetsenko D.A. // *Acta Naturae.* 2014. V. 6. P. 116–118. <https://doi.org/10.32607/20758251-2014-6-4-116-118>
8. 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>
9. Stetsenko D., Kupryushkin M., Pyshnyi D. // *Patent WO2016028187A1*, 2016.

10. *Wieland G., Simchen G.* // *Liebigs Ann. Chem.* 1985. V. 1985. P. 2178–2193.
<https://doi.org/10.1002/jlac.198519851108>
11. *Kitamura M., Murakami K.* // *Org. Synth.* 2015. V. 92. P. 171.
<https://doi.org/10.15227/orgsyn.092.0171>
12. *El-Faham A.* // *Org Prep. Proced. Int.* 1998. V. 30. P. 477–481.
<https://doi.org/10.1080/00304949809355316>
13. *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>

Synthesis of Novel Representatives of Phosphoryl Guanidine Oligonucleotides

S. A. Zhukov*, D. V. Pyshnyi*, **, and M. S. Kupryushkin*.*

#Phone: +7 (923) 243-26-23; e-mail: kuprummax@gmail.com; pyshnyi@niboch.nsc.ru

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

***Novosibirsk State University, Novosibirsk, ul. Pirogova 2, Novosibirsk, 630090 Russia*

In this work novel representatives of phosphoryl guanidine oligonucleotide derivatives were obtained. A synthetic scheme was proposed and implemented, suitable for preparation of a wide set of diaminocarbenium azides starting from different secondary amines, for subsequent incorporation of tetrasubstituted guanidine moieties into oligonucleotides by Staudinger reaction. A number of factors affecting the yields of phosphoryl guanidine derivatives were identified, such as size of alkyl substituents in the corresponding azide, purity of the azide, and carrying out elimination of protecting cyanoethyl group before final deblock of the oligonucleotide.

Keywords: automated oligonucleotide synthesis, modified oligonucleotides, organic azides, Staudinger reaction, phosphoryl guanidines, phosphoryl guanidine oligonucleotides (PGO)