



УДК 577.113.(4+7)

АДАПТАЦИЯ ПРОТОКОЛА АВТОМАТИЧЕСКОГО ТВЕРДОФАЗНОГО ФОСФИТАМИДНОГО СИНТЕЗА ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ИХ *N*-НЕЗАМЕЩЕННЫХ АМИДОФОСФАТНЫХ АНАЛОГОВ (P-NH₂)¹

© 2024 г. Е. А. Малова*, #, И. А. Пышная*, #, М. И. Мещанинова*, Д. В. Пышный*

* ФГБУН “Институт химической биологии и фундаментальной медицины” Сибирского отделения РАН,
Россия, 630090 Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8

Поступила в редакцию 20.02.2024 г.

После доработки 04.03.2024 г.

Принята к публикации 05.03.2024 г.

Предложен новый подход к автоматизированному синтезу *N*-незамещенных амидофосфатных олигодезоксирибонуклеотидов (P-NH₂), основанный на оптимизированном протоколе твердофазного фосфитамидного синтеза с использованием реакции Штаудингера. Показано быстрое и эффективное окисление модельных P^(III)-содержащих фосфиттриэфиров органическим азидом – (9-флуоренил)-метоксикарбонилазидом (FmocN₃) – до соответствующих фосфамидов –(OPO(OR)(NFmoc))–, где R – остатки нуклеозидной или алкильной природы. Удаление щелочелабильной флуоронильной группы с модифицированного межнуклеозидного звена позволяет получать в цепи олигонуклеотида электронейтральные (при физиологических условиях pH ~ 7) *N*-незамещенные амидофосфатные остатки (–(OPO(O)(NH₂))– или (P-NH₂)) вместо классических отрицательно заряженных фосфодиэфиров (–(OPO(O)(O[–]))– или (P-O[–])). При оптимизации синтетического протокола продемонстрировано, что для повышения эффективности синтеза P-NH₂-олигонуклеотидов (до ~80% на модифицированное звено) необходимо включение в протокол автоматического синтеза дополнительной стадии отщепления Fmoc-группы после проведения каждой стадии окисления растущей цепи олигомера по реакции Штаудингера. Показано практически полное отсутствие зависимости выхода P-NH₂-олигонуклеотидов как от локализации P-NH₂-звена в цепи, так и от типа модифицируемого динуклеотидного фрагмента. Получен набор моно- и бис-модифицированных октадезоксирибонуклеотидов и проведено детальное исследование термической стабильности комплементарных ДНК/ДНК-комплексов в различных буферных условиях. Показано, что в условиях высокой ионной силы раствора (1 M NaCl, pH 7.2) введение одного P-NH₂-звена снижает термостабильность комплекса ДНК в среднем на 1.3°C. При уменьшении ионной силы раствора дестабилизирующий эффект P-NH₂-модификации достоверно снижается, что дополнительное подтверждает электронейтральный статус вводимого амидофосфатного звена. Таким образом, нами разработан протокол получения частично модифицированных производных олигонуклеотидов, несущих незаряженные, но изоструктурные к нативным P-O-звеньям амидофосфатные остатки P-NH₂.

Ключевые слова: амидофосфатные производные олигодезоксирибонуклеотидов, автоматический синтез, реакция Штаудингера, оптимизация протокола синтеза

DOI: 10.31857/S0132342324060065, **EDN:** NFNVA

ВВЕДЕНИЕ

Основу всех известных на данный момент в биологии систем хранения и передачи генетической информации составляют биополимеры на основе

рибофуранозных нуклеиновых кислот (НК) – ДНК и РНК. Функциональные свойства этих биополимеров уникальны, к ним относятся, в частности, химическая стабильность фосфатных эфиров и ди-

¹ Дополнительные материалы к этой статье доступны по doi 10.31857/S0132342324060065 для авторизованных пользователей. Сокращения: НК – нуклеиновые кислоты; FmocN₃ – (9-флуоренил)-метоксикарбонилазид; ON – олигонуклеотид; PMO – морфолиновые олигонуклеотиды; PNA – пептидо-нуклеиновые кислоты; PGO – фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды; P-NH₂ – *N*-незамещенные амидофосфатные аналоги олигодезоксирибонуклеотидов.

Автор для связи: (+7 (383) 363-51-36; эл. почта: malova.ev.an@gmail.com, pyshnaya@niboch.nsc.ru).

эфиров [1] и доминирующее влияние полианионного фосфодиэфирного скелета на физико-химические свойства НК. Полианионный характер остава НК позволяет облегчить считывание информации путем стабилизации линейной протяженной конформации за счет отталкивания заряда, а также снимает ограничения растворимости, которые накладываются объемной структурой азотистых оснований [2].

С развитием химического синтеза фрагментов нукleinовых кислот – олигонуклеотидов (ОН) – обозначилось их фундаментальное и практическое приложение. Так, например, был предложен антисмысловой подход [3], позволяющий воздействовать на биосинтез белка посредством ингибирования трансляции мРНК за счет комплементарных взаимодействий с РНК-мишениями. Одни из основных препятствий к широкому использованию олигонуклеотидов с природными фосфодиэфирными связями *in vivo* – деградация олигонуклеотидов в присутствии нуклеаз и низкая эффективность внутриклеточного проникновения. Для снятия описанных ограничений проводятся исследования по разработке модифицированных олигонуклеотидов и их аналогов.

Известно много способов и подходов к изменению физико-химических свойств олигонуклеотидов, в том числе синтез аналогов НК с незаряженным оставом, таких как морфолиновые (PMO) и пептидонуклеиновые кислоты (PNA), алкилфосфонаты, фосфорилганидиновые (PGO) и другие *N*-замещенные амидофосфатные аналоги, а также *N*-незамещенные амилофосфаты (P-NH₂) [4–7]. На основе ряда незаряженных аналогов созданы и одобрены терапевтические препараты для лечения мышечной дистрофии Дюшенна (EXONDYS 51®, 2016; VYONDYS 53®, 2019; VILTEPSO®, 2020; AMONDYS 45®, 2021) [8, 9]. Незаряженные аналоги объединены репрезентативными свойствами – их устойчивостью к действию нуклеаз [10–13], способностью образовывать комплементарные комплексы с природными НК-мишениями [14–16], в особенности PGO гибридизуются даже в условиях с крайне низкой ионной силой растворов, что нереализуемо для природных ON [17]. Как правило, незаряженные последовательности ON характеризуются ограниченной растворимостью в водных растворах [18] и сложностью синтеза некоторых из их представителей [19–21]. В частности, синтез PMO и алкилфосфонатов подразумевает использование дорогостоящих специфических мономеров [22]. В случае PNA вовсе требуется наработка абсолютно неспецифических

для нуклеотидной химии аминокислотоподобных мономеров [23]. В этой связи следует отметить, что совместить получение незаряженных аналогов ON со стандартным автоматическим твердофазным амилофосфитным подходом к синтезу олигонуклеотидов, внедряя минимальное количество изменений, удается не всегда. Только при синтезе PGO-аналогов удалось создать подход, наиболее приближенный к стандартным условиям получения олигонуклеотидов [7, 24], поскольку этот способ реализован на основе использования классических общедоступных мономеров и базируется на использовании методики альтернативного окисления атома Р(III) по реакции Штаудингера, что совмещено с протоколом автоматического синтеза ON. Потенциал применимости PGO в области молекулярной диагностики и биомедицины уже убедительно продемонстрирован [25–32].

В ряду вышеописанных электронейтральных ON стоит обратить особое внимание на *N*-незамещенные амилофосфатные олигодезоксирибонуклеотиды (или P-NH₂-аналоги). В отличие от ранее описанных аналогов, P-NH₂ практически изоструктурны природным нукleinовым кислотам (в первом приближении имея ту же молекулярную массу), но в то же время электронейтральны, благодаря чему сильно отличаются по свойствам от нативных олигонуклеотидов. Впервые их синтез был описан в 1986 г. [33] на примере получения динуклеотида T*T, где звездочкой указано месторасположение модифицированного амилофосфатного звена. В рамках предложенного подхода проводили окислительное амидирование диэфирного Н-фосфонатного звена раствором аммиака (10%) в CCl₄. После долгого перерыва интерес к их синтезу вновь возник в 1996–1997 гг. [13, 34–39] параллельно у двух независимых групп под руководством Р. Айера и Б. Ренера. В рамках первых работ обозначилась проблема гидролиза при щелочном деблокировании, которую решали, применяя различные стратегии защиты мономеров, пригодные для удаления безводными аммиачными смесями [13, 34]. Кардинальных изменений в способах введения P-NH₂-модификации в углеводофосфатный остав не производили, основным подходом по-прежнему оставалось окислительное амидирование. Однако в 1997 г. группой Б. Ренера был представлен иной подход, основанный на окислении ОМе-фосфиттриэфирного звена растущей цепи ON по реакции Михаэлиса–Арбузова под действием иода и 2-нитробензиламина с последующим фотолитическим отщеплением 2-нитробензильного

остатка [36]. Указанные выше исследовательские группы смогли провести предварительные физико-химические и молекулярно-биологические исследования, в рамках которых показали перспективность *N*-незамещенных амидофосфатных ($\text{P}-\text{NH}_2$) аналогов в качестве антисмысловых олигонуклеотидов [35, 37–39]. Позднее, в 2014 г., группа под руководством Д.В. Пышного продемонстрировала подход к синтезу амидофосфатных аналогов с использованием алкил- и арилазидов [40]. На том этапе подход имел ограниченную совместимость этапа окисления выбранными азидами с протоколом стандартного автоматического синтеза ON. Неугасающий интерес к эффективному синтезу $\text{P}-\text{NH}_2$ продемонстрировала группа М. Карузерса [41], когда в 2015 г. они предложили новый метод постсинтетической модификации боранфосфонатных олигодезоксинуклеотидов посредством иод-зависимого замещения при атоме фосфора с целью получения $\text{P}-\text{NH}_2$ -аналогов. Основное ограничение данного подхода – необходимость использования для синтеза ON неканонических, коммерчески не доступных амидофосфитных мономеров. Таким образом, синтез *N*-незамещенных амидофосфатных аналогов по представленным схемам неоправданно дорогостоящий для различных групп разработчиков биологически активных соединений на основе ON.

Целью данного исследования было детальное изучение отдельных подходов к разработке унифицированного способа автоматического синтеза олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих *N*-незамещенные амидофосфатные остатки – $(\text{OPO}(\text{O})(\text{NH}_2))$ – ($\text{P}-\text{NH}_2$) вместо межнуклеозидных фосфатных остатков – $(\text{OPO}(\text{O})(\text{O}^-))$ – (PO). Создаваемый подход должен позволять вводить модификации в различные положения олигонуклеотидной цепи и должен быть совместим с использованием стандартных, коммерчески доступных амидофосфитных мономеров и твердофазных носителей на основе СРГ. В рамках такого подхода предшественником $\text{P}-\text{NH}_2$ -модификации может выступить органический азид, способный эффективно окислять промежуточный продукт олигонуклеотидного синтеза – фосфиттриэфир – и нести группировки, удаляемые при деблокировании целевого олигомера.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее в ряде работ [24, 42–44] была неоднократно показана применимость реакции Штадингера для получения *N*-замещенных амидофосфатных ON в рамках стандартного ами-

фосфитного твердофазного синтеза ON. При таком подходе фосфиттриэфир $\text{P}^{(\text{III})}$, образующийся на этапе конденсации амидофосфита и 5'-ОН-компоненты при наращивании ON-цепи, окисляется до иминофосфорана $\text{P}^{(\text{V})}$ при обработке органическим азидом. В данной работе мы также постарались оптимизировать использование окисления по классической схеме Штадингера для осуществления автоматического синтеза *N*-незамещенных амидофосфатных аналогов олигодезоксирибонуклеотидов. Для окисления $\text{P}^{(\text{III})}$ до $\text{P}^{(\text{V})}$ в ходе реакции Штадингера в качестве азидного компонента был выбран (9-флуоренил)-метоксикарбонилазид (FmocN_3). Соответствующий азид был получен из коммерчески доступного хлорформата (FmocCl) по методу, аналогичному описанному в работе [45]. Азид получен с высоким выходом и охарактеризован методами ^1H -ЯМР- и ИК-спектроскопии (рис. S1 и S2 в дополнительных материалах). Важно отметить, что Fmoc -группа относится к разряду щелочелабильных защитных остатков [45], что дает основание предполагать ее функциональную стабильность в рамках синтетического цикла при автоматическом синтезе ON.

На первом этапе исследования мы доказали (схема 1), что выбранный нами азид (FmocN_3) быстро реагирует как с 5'-DMTr-2'-дезокситимидин-3'-[$(\beta$ -цианэтил)-(*N,N*-диизопропил)]амидофосфитом (**I**), так и с 5'-DMTr-2'-дезокситимидин-3'-[$(\beta$ -цианэтил)-изопропил]фосфиттриэфиром (**II**). По данным ^{31}P -ЯМР-спектроскопии, соединения (**I**) и (**II**) менее чем за 5 мин после добавления FmocN_3 превращаются в соответствующие иминофосфораны (**III**) и (**IV**), что можно было ожидать из работы М.А. Баженова с соавт. [46]. Следует отметить, что взаимодействие органического азида (FmocN_3) с указанными $\text{P}^{(\text{III})}$ -содержащими соединениями фосфора протекало, как и ожидалось, с интенсивным выделением газа – молекулярного азота.

Реакции FmocN_3 с амилофосфитом и фосфиттриэфиром проводили непосредственно в ампулах ЯМР. Образование соединений (**III**) и (**IV**) регистрировали по ядрам $[^{31}\text{P}]$ без последующего выделения соответствующих продуктов в индивидуальном состоянии. По данным ЯМР-спектроскопии, переход от $\text{P}^{(\text{III})}$ -содержащих соединений, характеризуемых химическими сдвигами ~ 139 – 148 м.д., к $\text{P}^{(\text{V})}$ -содержащим аддуктам (химический сдвиг ~ 5.5 – 15.1 м.д.) регистрируется практически сразу после контакта FmocN_3 с источником трехвалентного фосфора. Таким образом, было доказано, что выбранный реагент FmocN_3 , при

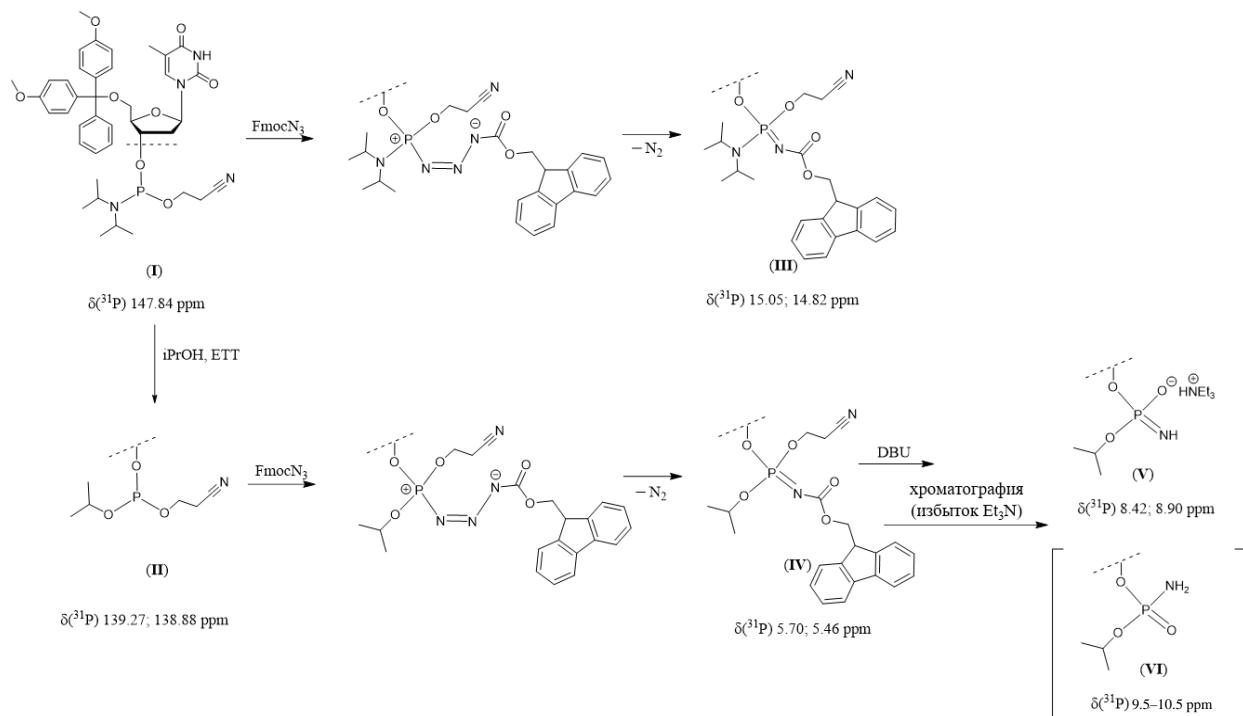


Схема 1. Стадии превращения тимидинамидофосфита при окислении FmocN_3 по реакции Штаудингера с указанием ${}^{31}\text{P}$ -ЯМР-характеристик, полученных в ходе эксперимента. Соединение (VI) не было зарегистрировано в ходе превращений и указано здесь как ожидаемый продукт с диапазоном химических сдвигов, представленным в литературе [41, 47].

используемых избытках (1 : 1.8 экв.) способен количественно окислять $\text{P}^{(\text{III})}$ -атом фосфора в составе соединений (I) и (II).

Обработка амидофосфата (IV) сильным основанием 1,8-диазабицикло[5.4.0]ундец-7-еном (DBU) должна была привести к получению изопропильного P-NH_2 -производного тимидилата (VI) (ожидаемый амидофосфат). К удивлению, химический сдвиг атома $[{}^{31}\text{P}]$ -фосфора, зарегистрированный для хроматографически чистого $\text{DMTr-2}'$ -дезокситимидин-3'-изопропиламинофосфата (V) (в форме смеси R_p - и S_p -диастереомеров), составил значения, равные 8.4 и 8.9 м.д. По данным работ [41, 47], для атома фосфора в составе P-NH_2 -модификации в цепи олигонуклеотида должны были бы регистрироваться значения химических сдвигов в диапазоне 9.5–10.5 м.д. (в зависимости от растворителя), что соответствует, по мнению авторов указанных работ, именно электронейтральной форме амилофосфатного звена. Позднее, получив T^*T_5 -олигонуклеотид (здесь и далее по тексту звездочкой указано место-расположение амилофосфатного звена, имеющего структуру $-(\text{OPO}(\text{O})(\text{NH}_2))$ – или $-(\text{OPO}(\text{O})(\text{NFmoc}))$ –, при необходимости уточнения приводятся сокращенные обозначения, например, $\text{T}(-\text{P}^{(\text{V})}-\text{NH}_2-\text{T})$ или $\text{T}(-\text{P}^{(\text{V})}=\text{N-Fmoc}-\text{T})$, мы

зарегистрировали химический сдвиг атома фосфора в составе амилофосфатного остатка, равный 11.8 м.д. (рис. S3 в дополнительных материалах), что соответствует ранее опубликованным данным [41, 47]. Мы считаем, что ожидаемый амилофосфат $-(\text{OPO}(\text{O})(\text{NH}_2))$ – (VI) (схема 1), после хроматографического выделения в присутствии избытка триэтиламина $((\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N})$, должен преимущественно находиться в виде стабильной ионизированной имидофосфатной формы $-(\text{OPO}(\text{N}=\text{H})(\text{O}^-))(\text{Et}_3\text{NH}^+)$ – (V). Этот факт подтверждается тем, что соединение (V) по данным ESI-MS-анализа (рис. 1) таковым и является, т.е. представляет собой солевую форму амилофосфата. Полученные данные хорошо согласуются с результатами работы [48], в которой показано, что амилофосфаты проявляют свойства слабых кислот ($\text{pK}_\text{a} \sim 8.2$).

Важно отметить еще раз, что воздействие FmocN_3 с $\text{P}^{(\text{III})}$ -содержащими соединениями позволяет практически количественно получать соответствующие $\text{P}^{(\text{V})}$ -содержащие аддукты. Таким образом, нами показано, что органический азид (в данном случае FmocN_3) потенциально пригоден для автоматического синтеза P-NH_2 -модифицированных олигомеров, т.к. может обеспечить быстрое, в течение нескольких минут, окис-

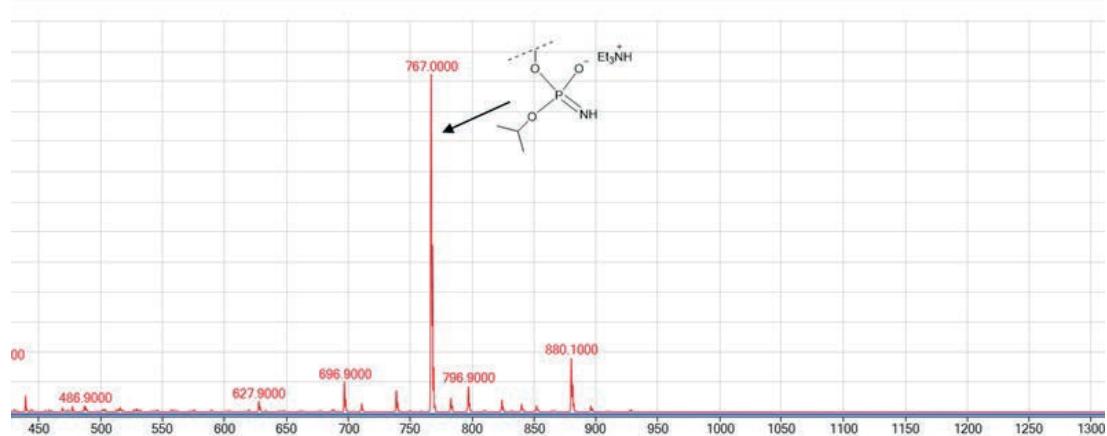


Рис. 1. ESI-MS-анализ соединения (V) (схема 1) в режиме регистрации положительных ионов.

ление фосфитов до Fmoc-содержащего амидофосфата (**IV**).

Далее мы апробировали реакцию окисления $P^{(III)}$ до $P^{(V)}$ с помощью $FmocN_3$ в формате автоматического ДНК-синтеза, используя стандартные коммерчески доступные 5'-DMTr-2'-дезокситимидин-3'-[$(\beta$ -цианэтил)-(N,N -дизопропил)]-фосфитамиды и твердофазный носитель (CPG), содержащий стандартный сукцинатный линкер. Включение $P-NH_2$ -модификации в состав растущего ON первоначально проводили, синтезируя модельный гексатимиидилат по протоколу, разработанному для синтеза фосфорилгуванидиновых аналогов [32].

На первом этапе провели синтез модельных гексатимиидилатов с одной (T^*T_5) и двумя ($T^*T^*T_4$) подряд $P-NH_2$ -модификациями вблизи 5'-конца цепи олигонуклеотида. Ожидалось, что на этапе краткосрочного (30 мин, 56°C) финального деблокирования олиготимиидилатных производных и отделения от твердофазного носителя концентрированным водным раствором аммиака [49] также должно происходить и удаление Fmoc-защитной группы с $P^{(V)}=N$ -Fmoc-модифицированного иминофосфоранового межнуклеозидного звена, что приводит к формированию N -незамещенного амидофосфатного олигодезоксирибонуклеотида. Однако по данным электрофоретического анализа в денатурирующем ПААГ и ОФ-ВЭЖХ (рис. S3 в дополнительных материалах) целевой продукт удалось получить только для мономодифицированного T^*T_5 гексатимиидилата со степенью превращения не более 35% (рис. S4 в дополнительных материалах, дорожка 2). Такой результат можно было ожидать, опираясь на данные работы относительно стабильности целевого N -незамещенного амидофосфата

в условиях аммонолиза [33]. Однако не следует исключать, что $P^{(V)}=N$ -Fmoc-производное может гидролизоваться и до удаления защитной группы [50].

С целью максимального смягчения условий щелочного деблокирования удаление цианэтильных защитных групп проводили в безводных условиях 50%-ным Et_3N в CH_3CN с последующим отщеплением ON от твердофазного носителя концентрированным водным аммиаком (30 мин, 25°C), финальное удаление DMTr-группы проводили 80%-ной уксусной кислотой после отщепления от полимерного носителя. Поскольку возможной причиной низкой конверсии в целевой продукт могло выступать неполное окисление $P^{(III)}$ на этапе реализации реакции Штайдингера в условиях твердофазного синтеза ON, была проанализирована эффективность получения гексатимиидилата T^*T_5 как в условиях дискретного возрастания концентрации окислителя $FmocN_3$ с 0.1 до 0.25 M, так и варьируя продолжительность этого технологического этапа – 15, 30 и 45 мин. В составе реакционных смесей, отнесенных по совокупности данных масс-спектрометрического (рис. S5 в дополнительных материалах) и хроматографического анализов, идентифицированы нативные пента- и гексатимиидилаты (T_5 и T_6) и целевой N -незамещенный продукт, T^*T_5 (рис. 2, фракции 1, 2 и 3 соответственно). Кроме того, анализ показал, что при использовании краткосрочной схемы аммонолиза концентрированным водным аммиаком (30 мин, 25°C) исчерпывающего удаления Fmoc-защиты не происходит (рис. 2, фракция 4). Стоит особенно отметить, что данный Fmoc-содержащий амидофосфат, несущий модифицированное фосфородиэфирное звено, аналогично таковому в соединении

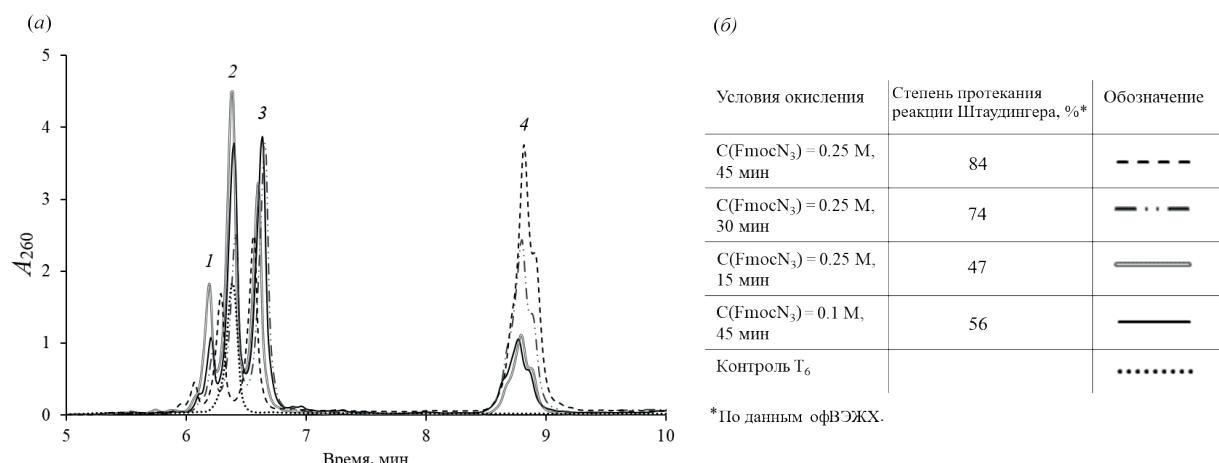


Рис. 2. (а) – оффВЭЖХ-анализ реакционных смесей гексатимилилатов (T^*T_5), полученных в разных условиях окисления по реакции Штаудингера и обработанных концентрированным водным аммиаком в течение 30 мин при 25°C. Градиент концентрации ацетонитрила 0–30% за 15 мин. Соотнесение пиков проводили по совокупности данных масс-спектрометрического анализа (рис. S4 в дополнительных материалах) и сравнения с контрольным олигонуклеотидом T_6 : пик 1 – T_5 , пик 2 – T_6 , пик 3 – $T(-P(V)-NH_2)-T_5$, пик 4 – $T(-P(V)=N-Fmoc)-T_5$; (б) – условия окисления и степень протекания реакции Штаудингера без учета степени деструкции модифицированного звена, полученные как отношение суммы интегральных площадей пиков 3 и 4 к сумме интегральных площадей всех компонентов реакционной смеси (по данным оффВЭЖХ).

(IV) (схема 1), по-видимому, неустойчив в условиях электроспрей-ионизации. По данным MALDI-TOF-масс-спектрометрического анализа (рис. S6 в дополнительных материалах), хроматографически чистая фракция 4 (рис. 2) имеет в своем составе как гидрофобный защищенный гексатимилилат $T(-P(V)=N-Fmoc)-T_5$, так и значительно более гидрофильный (фракция 3) целевой мономодифицированный продукт, т.е. $T(-P(V)-NH_2)-T_5$. Результаты эксперимента четко указывают на то, что увеличение концентрации азива на этапе окисления и увеличение длительности данного этапа значительно повышают выход модифицированного $P-NH_2$ -аналога. Важно отметить, что нам удалось, повысив концентрацию окислителя и время обработки $FmocN_3$, достичь более чем 80%-ной суммарной конверсии в олигомер T^*T_5 , по данным оффВЭЖХ, даже при использовании классического аммонолиза на финальном этапе синтеза ON.

Таблица 1. Стартовый протокол для синтеза модельных гексатимилилат-*N*-незамещенных амидофосфатных олигонуклеотидов в рамках амидофосфитного твердофазного метода синтеза, разработанный по аналогии с протоколом для синтеза фосфорилгидиновых олигонуклеотидов [32]

Стадия	Реагент и условия	Время
Детритилирование	3%-ная трихлоруксусная кислота в CH_2Cl_2	172 с
Конденсация	0.07 М амидофосфит, 0.25 М 5-этилтио-1 <i>H</i> -тетразол в CH_3CN	151 с
Кэпирование	CapA (15% $(CH_3CH_2CO)_2O$ в ТГФ) CapB (13% 1-MeIm, 13% Py в ТГФ)	109 с
Окисление или окисление по Штаудингеру	0.02 М I_2 , 1% Py, 9% H_2O в ТГФ 0.1 М $FmocN_3$ в CH_3CN	27 с 1800 с
Деблокирование	Концентрированный $NH_3 \cdot H_2O$	1–48 ч

ным временем окисления по реакции Штадингера до 45 мин, дополнительно обработали концентрированным водным аммиаком в течение 24 ч и метанольно-аммиачной смесью в течение 24 ч соответственно (рис. 3, дорожки 6 и 7 соответст-

венно). Электрофоретический анализ показал высокую степень гидролиза модифицированных звеньев в случае обработки реакционной смеси концентрированным водным аммиаком; напротив, обработка метанольно-аммиачной смесью не привела к значительной деструкции амидофосфатных групп.

Полученный результат позволяет обоснованно считать, что связь $P-NH_2$ стабильна при обработке метанольно-аммиачной смесью, что подтверждается результатами работы [13]. Однако выбранный подход к удалению защитных групп не позволяет полностью удалить Fmoc-группу за 24 ч, в связи с чем было принято решение использовать предшествующее аммонолизу отщепление Fmoc-защиты обработкой раствором сильного основания (DBU) без отщепления от полимерного носителя согласно работе [34]. На следующем этапе работы мы провели синтез T^*T_5 с дополнительной обработкой DBU в ацетонитриле перед аммонолизом. В результате электрофоретического разделения реакционной смеси выявлено отсутствие модифицированного олигонуклеотида в ее составе (рис. 3, дорожка 4). Учитывая ранее показанную устойчивость $P-NH_2$ -связи к деблокированию в метанольно-аммиачной смеси и к обработке DBU в безводных условиях, причиной отсутствия целевого соединения в реакционной смеси сочли гидролиз $(-P^{(V)}=N-Fmoc-)$ -фрагмента на стадии детритилирования трихлоруксусной кислотой. Предполагаемый механизм включает в себя протонирование сложноэфирной группы Fmoc-фрагмента с последующей локализацией положительного заряда на атоме фосфора и нуклеофильной атакой молекулой воды (схема 2). Присутствие воды на стадии детритилирования полностью исключить невозможно, поскольку в синтетическом цикле присутствует вода в составе иод-содержащего окислителя.

Во избежание гидролиза Fmoc-защищенного олигонуклеотида в кислых условиях в протокол синтеза ввели стадию отщепления защитных групп у амидофосфатного звена обработкой DBU, и, таким образом, в синтетическом цикле стадии детритилирования предшествует стадия

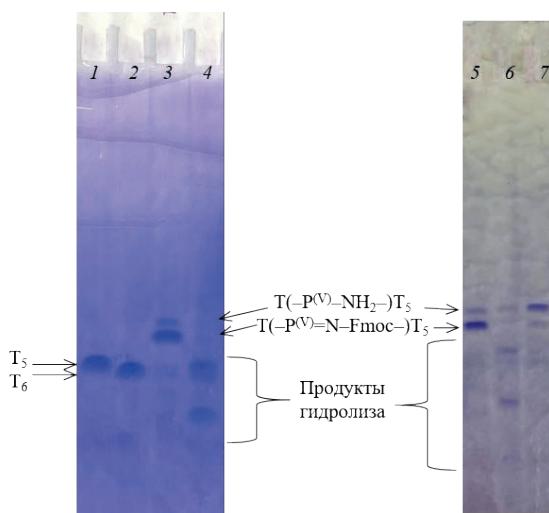


Рис. 3. ПААГ-электрофорез в денатурирующих условиях (8 М мочевина, 89 mM Tris-богатый буфер, pH 8.3) реакционных смесей олигонуклеотидов T^*T_5 , полученных по протоколу, описанному в табл. 1, с использованием 0.25 M раствора $FmocN_3$ и продолжительностью окисления по реакции Штадингера 45 мин в зависимости от последовательной постсинтетической обработки: 1, 2 – контрольные T_5 и T_6 соответственно; 3, 5 – аммонолиз (концентрированный водный аммиак, 30 мин), детритилирование (80%-ная уксусная кислота, 10 мин); 4 – детритилирование на CPG (3%-ная трихлоруксусная кислота в CH_2Cl_2 , 2 мин), удаление Fmoc-группы на CPG (2%-ный раствор DBU в ацетонитриле, 5 мин), аммонолиз (метанольно-аммиачная смесь, 2 ч); 6 – аммонолиз (концентрированный водный аммиак, 30 мин), детритилирование (80%-ная уксусная кислота, 10 мин), дополнительный аммонолиз (концентрированный водный аммиак, 24 ч); 7 – аммонолиз (концентрированный водный аммиак, 30 мин), детритилирование (80%-ная уксусная кислота, 10 мин), дополнительный аммонолиз (метанольно-аммиачная смесь, 24 ч). Отнесение основных пятен произведено по данным ESI-MS-анализа после выделения оффВЭЖХ (рис. S5 в дополнительных материалах).

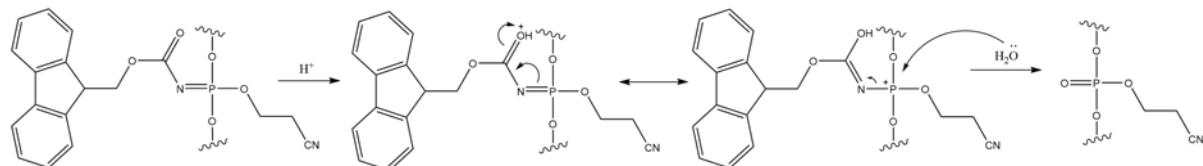


Схема 2. Предполагаемый механизм гидролиза Fmoc-содержащего фрагмента на стадии детритилирования трихлоруксусной кислотой во время синтеза $P-NH_2$ -олигонуклеотидов.

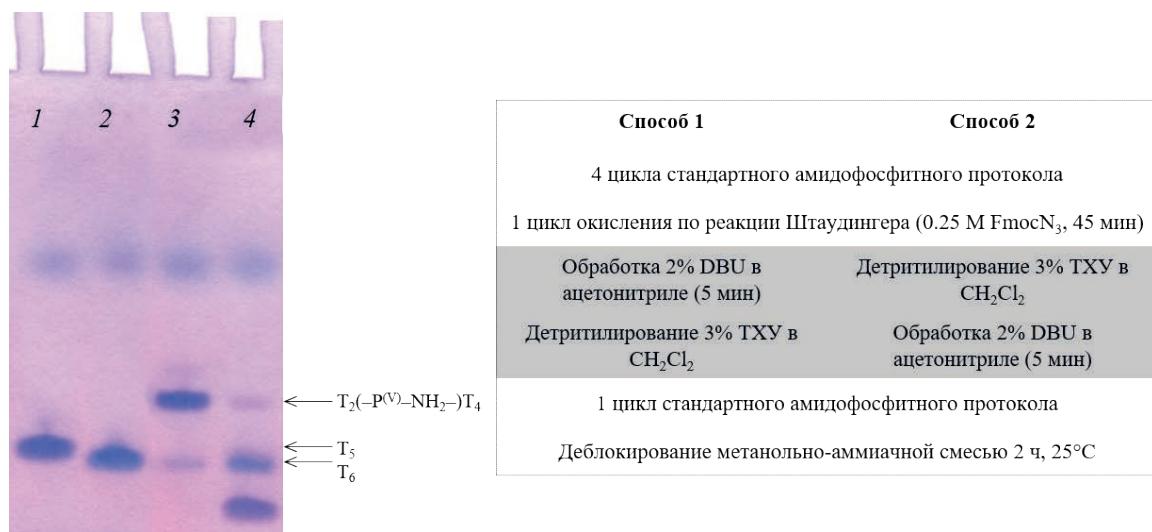


Рис. 4. ПААГ-электрофорез в денатурирующих условиях (8 М мочевина, 89 mM Tris-боратный буфер, pH 8.3) реакционных смесей: 1 и 2 – контрольные олигонуклеотиды T₅ и T₆ с природными фосфодиэфирными связями; 3 – T₂*T₄, полученный по способу 1; 4 – T₂(-P(V)-NH₂)-T₄, полученный по способу 2.

отщепления Fmoc- и β -цианэтильной групп с образованием $(-\text{P}(\text{O})-\text{NH}_2-)$ -фрагмента. Внедрение дополнительной стадии в цикл синтеза первоначально проводили вне автоматического синтезатора, для чего извлекали CPG с Fmoc-содержащим олигонуклеотидом из реакционной колонки и обрабатывали в пробирке раствором DBU в ацетонитриле в течение 5 мин при комнатной температуре. Экспериментально показано (рис. 4, дорожка 3), что свободная $(-\text{P}(\text{V})-\text{NH}_2-)$ -связь устойчива к обработке трихлоруксусной кислотой и другими реагентами, используемым в синтетическом цикле.

Таким образом, внедрение дополнительной стадии отщепления защитных групп у модифицированного фосфата и использование мягкого щелочного деблокирования метанольно-аммиачной смесью позволило разработать протокол

синтеза P-NH₂-олигонуклеотидов с применением отечественного оборудования, например, ASM-800 (Биоссет, Россия), стандартных коммерчески доступных мономеров и полимерных носителей (табл. 2).

Следует отметить, что при однократной модификации конверсии в целевой продукт $>85\%$ нам добиться не удалось. Так, при синтезе олигомера T*T₅, по данным ВЭЖХ-анализа, наблюдается $\sim 13\%$ продуктов гидролиза после обработки CPG-связанного олигонуклеотида метанольно-аммиачной смесью в течение первых двух часов при комнатной температуре (рис. 5, точка 0; рис. S7 в дополнительных материалах, хроматография 0). Видно, что вплоть до 5 ч дополнительного выдерживания T*T₅ в среде NH₃/CH₃OH при 56°C значимой деградации амидофосфат-содержащего аналога не происходило. Лишь спустя сутки (56°C) уровень

Таблица 2. Протокол синтеза N-незамещенных амидофосфатных (P-NH₂) олигонуклеотидов в рамках амидофосфитного метода синтеза с использованием стандартных коммерчески доступных мономеров и полимерных носителей для отечественного ДНК/РНК-синтезатора ASM-800 (Биоссет, Россия)

Стадия	Реагент и условия	Время
Детритилирование	3%-ная трихлоруксусная кислота в CH ₂ Cl ₂	172 с
Конденсация	0.07 М амидофосфит, 0.25 М этилтиотетразол в CH ₃ CN	151 с
Кэпирование	CapA (15% (CH ₃ CH ₂ CO) ₂ O в ТГФ) CapB (13% 1-MeIm, 13% Py в ТГФ)	109 с
Окисление или окисление по Штаудингеру	0.02 М I ₂ , 1% Py, 9% H ₂ O в ТГФ 0.25 М FmocN ₃ в CH ₃ CN	27 с 2700 с
Удаление Fmoc-группы	2% DBU в CH ₃ CN	300 с
Деблокирование	Метанольно-аммиачная смесь	1–24 ч

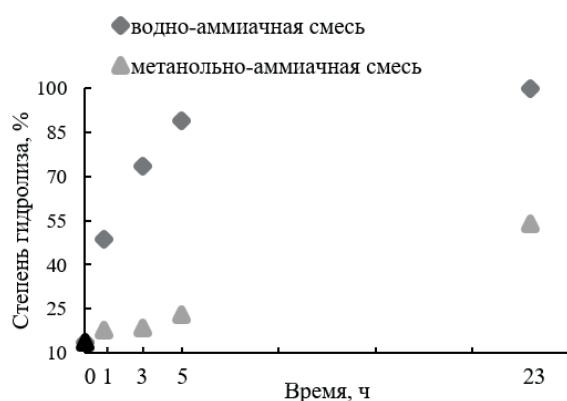


Рис. 5. Устойчивость $\text{P}-\text{NH}_2$ -олигонуклеотидов к деблокированию метанольно-аммиачной смесью по сравнению со стандартным удалением защитных групп с использованием концентрированного водного амиака, определенная по данным оФВЭЖХ.

деградации целевого продукта приближался к 50% (рис. 5, точка 23 ч; рис. S7 в дополнительных материалах, хроматография Б4). Напротив, в случае дополнительного выдерживания в среде $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}$ при 56°C спустя 1 ч заметна серьезная деградация амидофосфатной группы. Следует отметить, что в случае использования для синтеза олигомеров НК коммерчески доступных мономеров со стандартными защитными группами рекомендованное время деблокирования НК водно-аммиачной смесью не превышает 40 ч при комнатной температуре [52]. В случае использования метанольно-аммиачной смеси достаточно 18 ч при комнатной температуре, что было подтверждено экспериментально (рис. S8 в дополнительных материалах). Поскольку результат эксперимента демонстрирует устойчивость амидофосфатной группы к метанольно-аммиачной смеси на довольно продолжительном промежутке времени, “исходная” степень деструкции $(-\text{P}^{(\text{V})}-\text{NH}_2-)$ -содержащего олигонуклеотида, полученная

после первых двух часов деблокирования при комнатной температуре и превышающая 10% по данным оФВЭЖХ, не может быть вызвана гидролизом модифицированного звена в ходе деблокирования.

Последующие эксперименты были направлены на выяснение других причин, влияющих на выход целевого N -незамещенного амидофосфатного олигонуклеотидного продукта. Для этого мы поставили задачи установить, зависит ли степень гидролиза амидофосфатной связи от следующих факторов:

- 1) места расположения одиночной $\text{P}-\text{NH}_2$ -модификации в цепи олигонуклеотида,
- 2) типа прилегающих к ней нуклеозидов,
- 3) стадии синтетического цикла.

1) Для оценки влияния места расположения модификации были синтезированы гексатимидилаты, содержащие одиночную $(-\text{P}^{(\text{V})}-\text{NH}_2-)_2$ -группу в каждом из пяти межнуклеозидных положений (T_5^*T , T_4^*T_2 , T_3^*T_3 , T_2^*T_4 , T^*T_5). Данный прием должен был показать, является ли увеличение числа циклов синтеза нативных фосфодиэфирных звеньев, последовавших за введением $(-\text{P}^{(\text{V})}-\text{NH}_2-)$ -остатков, фактором, определяющим степень гидролиза амидофосфатного фрагмента цепи ON. Было установлено, что вне зависимости от локализации в цепи одиночной амидофосфатной модификации конверсия в целевой гексатимидилатный продукт, по данным оФВЭЖХ, составляет в среднем 72%, т.е. не зависит от положения введения $(-\text{P}^{(\text{V})}-\text{NH}_2-)$ -группы (табл. 3, фактор А).

2) Для ответа на вопрос, поставленный следующей задачей, мы провели синтез двух серий тетрамерных олигонуклеотидов, содержащих вблизи либо 5'-, либо 3'-конца цепи одиночную модификацию динуклеотидного звена $\text{X}(-\text{P}^{(\text{V})}-\text{NH}_2-)\text{T}$, где $\text{X} = \text{G}, \text{C}, \text{A}$ или T (табл. 3, фактор Б). Установлено,

Таблица 3. Степень полноты протекания реакции Штаудингера, оцененная по данным оФВЭЖХ, в зависимости от факторов, влияющих на устойчивость связи $(-\text{P}^{(\text{V})}-\text{NH}_2-)$, таких как: 1 – число стандартных циклов амидофосфитного синтеза, следующих после стадии модификации; 2 – химическое строение динуклеотида в составе модифицированного звена

Фактор 1		Фактор 2			
Последовательность 5'→3'	Доля целевого ON, %	Последовательность 5'→3'	Доля целевого ON, %	Последовательность 5'→3'	Доля целевого ON, %
TTTT*T	79	G*TTT	60	TTG*T	70
TTTT*TT	73	C*TTT	64	TTC*T	69
TTT*TTT	73	A*TTT	48	TTA*T	69
TT*TTTT	64	T*TTT	74	TTT*T	75
T*TTTTT	72	–	–	–	–

что, по данным количественного анализа профилей ВЭЖХ, выход целевых P-NH_2 -аналогов составляет в среднем ~70%.

3) Для выявления стадии синтетического цикла, оказывающей превалирующее влияние на устойчивость ($-\text{P}^{(\text{V})}-\text{NH}_2-$)-связи, был проведен скрининг стадий и условий получения T_5^*T . После стадии окисления промежуточного фосфит-триэфира олигонуклеотида раствором FmocN_3 (0.25 М) мы последовательно исключали все стадии технологического цикла (представлены на рис. S9 в дополнительных материалах), обрабатывая затем твердофазный носитель метанольно-аммиачной смесью и оценивая состав реакционных смесей методом офВЭЖХ. На первом этапе выявить основную стадию, в ходе которой бы наблюдалось значимое уменьшение конверсии, не удалось из-за сравнительно малого количества побочных продуктов. Анализируя состав побочных продуктов, первым делом мы решили исключить гидролиз водой, входящей в состав окислителя, и преднамеренно обработали CPG с $\text{T}_5(-\text{P}^{(\text{V})}-\text{NH}_2)\text{T}$ раствором, содержащим 9% воды и ТГФ в качестве растворителя. При повторном исключении стадий и анализе реакционных смесей получили прирост к содержанию T_5 относительно предыдущего эксперимента, в то время как содержание T_6 оставалось на прежнем уровне (рис. S9 в дополнительных материалах). Обнаруженный факт привел к заключению: гомогенность реакционных смесей P-NH_2 -олигонуклеотидов, получаемых по разработанному протоколу, напрямую зависит от полноты протекания реакции Штаудингера и практически не обусловливается используемыми в синте-

тическом цикле реагентами и деблокирующими смесями. В итоге, повторив синтез T_5^*T с использованием дополнительного окисления иодом после стадии удаления Fmoc-защитной группы, мы получили прирост к содержанию T_6 в сравнении с синтезом без дополнительной стадии окисления (рис. 6).

При попытке достичнуть полного протекания реакции Штаудингера мы провели синтез T_5^*T с использованием насыщенного раствора FmocN_3 (~0.63 М). К сожалению, используя повышенную концентрацию, не удалось добиться полной конверсии (содержание побочных продуктов составило ~10%). Особенно остро проблема неполной конверсии в целевой амидофосфатный олигонуклеотид встает при переходе к множественной модификации олигонуклеотидной цепи. Причину частичного окисления с использованием FmocN_3 в ходе твердофазного синтеза предстоит выяснить в будущих экспериментах.

Гибридационные свойства $\text{P-NH}_2\text{-ON}$.

Отметим, что к настоящему времени имеется лишь крайне ограниченный набор данных, описывающих комплексообразующие свойства P-NH_2 -амидофосфатов [25, 35–37]. Именно поэтому мы исследовали способность серии октамерных ДНК, нативного (N_8) и модифицированных олигонуклеотидов (N_{x*y*z} , где x, y, z – порядковые числа нуклеозидов в составе модифицированного звена) к формированию комплементарных комплексов с матричным октамером M_8 . Отдельной задачей была попытка определить роль влияния P-NH_2 -модификации на зависимость температуры плавления ($T_{\text{пл}}$) от ионной силы раствора (табл. 3, рис. 7).

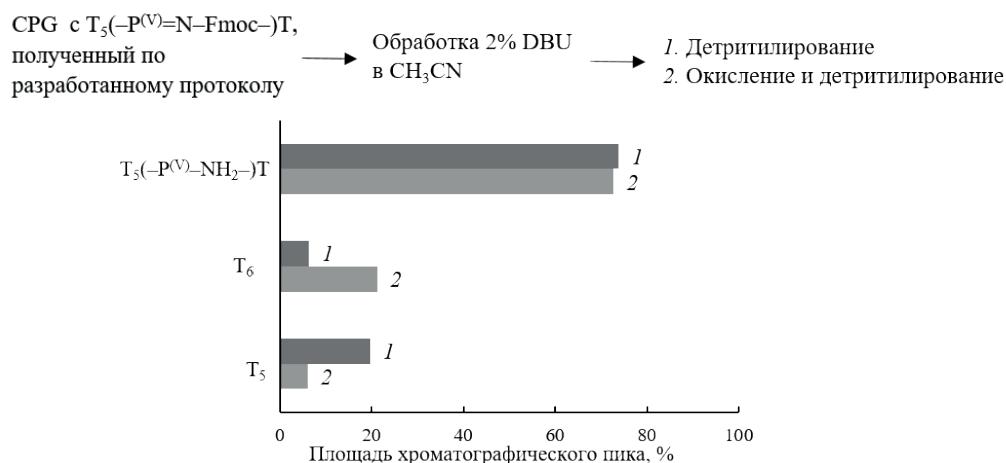


Рис. 6. Схема эксперимента по оценке влияния стадии дополнительного окисления смесью $\text{I}_2/\text{Py}/\text{H}_2\text{O}$ на соотношение побочных продуктов при синтезе P-NH_2 -олигонуклеотида. Оценку влияния проводили по данным оффВЭЖХ.

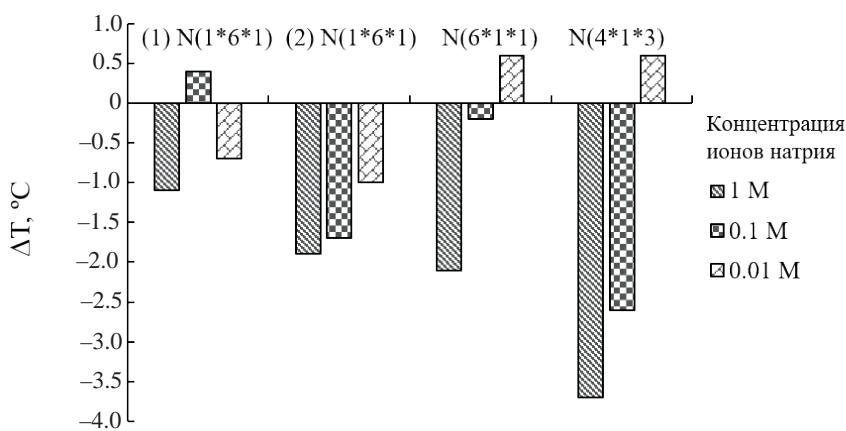


Рис. 7. Вклад P-NH₂-модификации в термическую стабильность (ΔT) комплементарных комплексов бисмодифицированных олигодезоксирибонуклеотидов с матрицей AGCTACCG в зависимости от ионной силы раствора относительно немодифицированного комплекса.

Важно отметить, что именно данный фактор – электронейтральность модификации – это ключевое свойство, определяющее фундаментальный потенциал использования рассматриваемых изоструктурных P-NH₂-аналогов нативных олигонуклеотидов.

В табл. 4 представлены термодинамические параметры комплексообразования нативной ДНК-матрицы с набором модельных октануклеотидов (N_{x*y*z}) в стандартных буферных условиях (1 M NaCl, 10 mM какодилат натрия, pH 7.3). Данные были получены методом термической денатурации с оптической регистрацией сигнала во много волновом режиме [17]. Представленные данные – результат анализа как профилей кривых терми-

ческой денатурации, так и ренатурации анализируемых дуплексов. Следует отметить, что взаимодействие всех модельных олигомеров с ДНК-матрицей демонстрирует строго равновесный характер комплексообразования. С учетом погрешности определения величины температуры плавления исследуемых комплексов ($\sim 0.2^\circ\text{C}$) [53] установлено, что введение амидофосфатных остатков в структуру октануклеотидов лишь незначительно влияет на их сродство к мишени ДНК в условиях высокой ионной силы раствора (1 M NaCl) (табл. 4). Вне зависимости от позиции введения модификации в структуре олигомера и числа модифицированных звеньев в среднем наличие одного ($-\text{P}^{(\text{V})}-\text{NH}_2-$)-звена приводит

Таблица 4. Результаты исследования термической стабильности олигонуклеотидных комплексов с разным числом и расположением N-незамещенных амидофосфатных групп в олигонуклеотиде N_{x*y*z} в условиях высокой ионной силы (1 M NaCl)

Комплементарный комплекс AGCTACCG матрицы с олигонуклеотидом	Выход ON после оФВЭЖХ, %	ΔS° , кал/(К·моль)	ΔH° , ккал/моль	ΔG°_{37} , ккал/моль	$T_{\text{пл}}$, $^\circ\text{C}$	ΔT , $^\circ\text{C}$	$\Delta T/\text{mod}$, $^\circ\text{C}$
N_8	CGGTAGCT	–	-142 ± 1	-51.5 ± 3.9	-7.4 ± 0.2	39 ± 1	–
$N_{(1*7)}$	C*GGTAGCT	23	-162 ± 2	-57.3 ± 0.7	-7.0 ± 0.1	36 ± 1	-3
$N_{(4*4)}$	CGGT*AGCT	29	-175 ± 3	-61.4 ± 0.9	-7.2 ± 0.1	38 ± 1	-1
$N_{(7*1)}$	CGGTAGC*T	49	-157 ± 4	-56.0 ± 1.3	-7.3 ± 0.1	38 ± 1	-1
(1) $N_{(1*6*1)}$	C*GGTAGC*T	15	-157 ± 3	-55.9 ± 0.9	-7.1 ± 0.1	37 ± 1	-2
(2) $N_{(1*6*1)}$	C*GGTAGC*T	23	-132 ± 1	-48.2 ± 0.3	-7.2 ± 0.1	37 ± 1	-2
$N_{(6*1*1)}$	CGGTAG*C*T	33	-146 ± 4	-52.5 ± 1.3	-7.2 ± 0.1	38 ± 1	-1
$N_{(4*1*3)}$	CGGT*A*GCT	22	-165 ± 4	-58.1 ± 1.3	-6.9 ± 0.1	36 ± 1	-3
$N_{(1*1*6)}$	C*G*GTAGCT	28	-142 ± 9	-51.0 ± 2.9	-7.0 ± 0.1	37 ± 1	-1

Примечание: для последовательности $N_{(1*6*1)}$ удалось разделить две смеси диастереомеров (1) и (2).

к снижению термической стабильности ДНК-комплексов на 1.0–2.0°C. Этот факт согласуется с данными работ французских исследователей [35]. Следует отметить, что термостабильность комплексов, формируемых различными фракциями диастереомеров олигомера $N_{(1*6*1)}$, разделенных с помощью ВЭЖХ, в условиях высокой ионной силы раствора практически не отличается (табл. 4).

Снижение ионной силы буферного раствора (при дискретном переходе от 1 к 0.1 и до 0.01 М раствора NaCl) показало, что для рассмотренных бисмодифицированных октануклеотидов явно выражен эффект введения электронейтральной P-NH₂-модификации (рис. 7; табл. S1 в дополнительных материалах). При исследовании мономодифицированных комплексов не удалось обнаружить статистически значимую зависимость от ионной силы раствора. Очевидно, что наличие P-NH₂-модификации в цепи олигомера приводит к достоверно значимому снижению заряд-обусловленной компоненты энергии взаимодействия комплементарных цепей. Заметим, что в ряде случаев при пониженной ионной силе (0.01 М NaCl) (–P^(V)–NH₂–)-содержащие аналоги демонстрируют даже несколько большую термостабильность комплементарных комплексов с ДНК-матрицей относительно таковых с участием нативных олигонуклеотидов. При этом, по-видимому, наблюдается некоторая зависимость термодинамического эффекта от локализации, нуклеотидной последовательности сайта модификации, а также его диастереомерного состояния.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали азид натрия (NaN₃), тетраметилэтилендиамин (TEMED), катионный карбоцианиновый краситель Stains-All, трис-(гидроксиметил)аминометан (Трис), какодилат натрия (Sigma-Aldrich, США); (9-флуоренил)-метоксикарбонилхлорид (FmocCl) (Fluka, Швейцария); трихлоруксусную кислоту, пиридин, триэтиламин, хлорид натрия, тетрагидрофуран (ТГФ) (Panreac, США); 5-(этилтио)-1Н-тетразол (ETT) (Glen Research, США); 1-метилимидазол (Carl Roth GmbH + Co. KG, Германия); пропионовый ангидрид, 7 М раствор аммиака в метаноле (Acros Organics, США); кристаллический иод, ледяную уксусную кислоту, динатриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (Na₂EDTA), водный аммиак, спирт изопропиловый (Реахим, Россия); (1,8-диазабицикло[5.4.0]ундец-7-ен) (DBU) (Alfa Aesar, Германия); акриламид, N,N'-метиленбисакриламид, персульфат аммония (PSA) (AppliChem, Германия); бромфеноловый синий, (AppliChem, Германия); бромфеноловый синий,

ксиленцианол FF (Helicon, Россия); борную кислоту (Химпром, Россия); мочевину (Союзхимпром, Россия); стандартные мономеры для фосфорамидитного протокола, полимерные носители для твердофазного автоматического синтеза с тимидин-, дезоксиаденозин- и дезоксигуанозин-3'-расщепляемым линкером (ChemGenes Co, США); воду бидистиллированную, ацетонитрил (CH₃CN) для ВЭЖХ (Fisher Chemical, Китай); дихлорметан (Вектон, Россия); ацетонитрил-*d*₃, пластиинки для TCX TLC Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, США); хлороформ-*d* (Solvex, Россия).

Реактивы и растворители были квалификации х.ч. и о.с.ч. отечественного и импортного производства. Абсолютизирование растворителей проводили стандартными методами с последующим выдерживанием над молекулярными ситами или гидридом кальция.

Масс-спектрометрический анализ (ESI и MALDI-TOF) исследованных соединений проводили в Центре масс-спектрометрического анализа ИХБФМ СО РАН на оборудовании MALDI-TOF AutoFlex Speed (Bruker Daltonics, Германия) и ESI LC/MS/MSD XCT (Agilent Technologies, США); определяемый диапазон масс – 105–1600 *m/z*.

Спектры ЯМР регистрировали на спектрометре Magritek Spinsolve (Новая Зеландия) с частотой 80 МГц (¹H – 80 МГц, ³¹P – 32 МГц) в CH₃CN (при записи ³¹P) или дейтерированном хлороформе (при записи ¹H).

Структуру органического азида (FmocN₃) устанавливали с использованием ИК-Фурье-спектрометра Tensor 27 (Bruker, Германия) на базе НИОХ СО РАН им. Н.Н. Ворожцова. Спектр регистрировали в кювете диаметром 0.28 мм, растворителем выступал хлороформ, концентрация раствора исследуемого азида составила 1 масс.%. ИК-спектр регистрировали в диапазоне 4000–400 см^{–1}. Идентификацию химического состава азида проводили по характеристическим полосам поглощения, представленным в литературе [54].

Электрофоретическую подвижность олигонуклеотидов и их аналогов оценивали, используя 15%-ный ПААГ (акриламид : N,N'-метиленбисакриламид 29 : 1), 8 М мочевина, 89 мМ Трис-борат, pH 8.3, 2 мМ Na₂EDTA, 0.08% TEMED, 0.1% PSA) при напряжении 12 В/м в диапазоне 30–40 мин. Пробы наносили из буферного раствора, содержащего 0.1 мг/мл ксиленцианола FF в 8 М мочевине. Подвижность оценивали относительно лидирующего красителя – бромфенолового синего. Результаты электрофоретического разделения визуализировали окрашиванием с помощью 0.05%-ного раствора Stains-all в 50%-ном формамиде.

Аналитическую обращенно-фазовую высокоэффективную жидкостную хроматографию (оффВЭЖХ) реакционных смесей образцов проводили на хроматографе Милихром А02 (Эконова, Россия) с использованием колонки (2×75 мм) с сорбентом ProntoSIL-120-5-C18 (Эконова, Россия) и градиента концентрации CH_3CN (0–30%) в 0.02 М водном растворе триэтиламмония ацетата (рН 7.0) в течение 30 мин (скорость потока 200 мкл/мин, температура термостата 35°C). Детекцию ON осуществляли на длинах волн 260, 280 и 300 нм.

Очистку олигонуклеотидов проводили методом оффВЭЖХ на хроматографе Agilent 1100 series (Agilent, США). Использовали колонку (4.6×150 мм) с сорбентом Eclipse XDB-C18 (5 мкм) (Agilent, США), элюировали в градиенте концентрации CH_3CN от 0 до 50% в 0.02 М растворе триэтиламмония ацетата (рН 7.0) за 40 мин, скорость потока 1.5 мл/мин.

Амидофосфатные аналоги олигодезоксирибонуклеотидов синтезировали на автоматическом ДНК/РНК-синтезаторе ASM-800 (Biosset, Россия) с использованием коммерчески доступных мономеров (0.1 М) для амидофосфитного протокола, в качестве активатора применяли раствор ETT (0.25 М) в CH_3CN . В качестве кэпирующих агентов выступали СрА – 15%-ный пропионовый ангидрид в ТГФ, СрВ – 16%-ный *N*-метилимидазол в ТГФ. 5'-Диметокситритильную защитную группу удаляли 3%-ной трихлоруксусной кислотой в CH_2Cl_2 . Триэфирфосфиты окисляли до триэфирфосфатов смесью 0.05 М I_2 , 1% пиридина, 9% H_2O в ТГФ. Для получения межнуклеозидного амидофосфата на стадии окисления в процессе твердофазного автоматического синтеза использовали альтернативную программу, основанную на реакции Штаудингера. В качестве окислителя применяли 0.1 М или 0.25 М раствор FmocN_3 в CH_3CN . Суммарное время окисления составляло 15–45 мин. Удаление Fmoc -защитной группы проводили обработкой 2%-ным раствором DBU в CH_3CN в течение 5 мин либо в ходе синтетического цикла на автоматическом ДНК-синтезаторе, либо отдельно в пробирке объемом 1.5 мл.

Термическую денатурацию олигонуклеотидных комплексов проводили на спектрофотометре Cary 300 Biomelt (Varian, Австралия), оснащенном терморегулируемой 6-куветной приставкой. Компоненты комплексов в эквимолярном соотношении (суммарная концентрация 10 мкМ) в буферном растворе (10 мМ какодилат натрия, 100 мМ NaCl , рН 7.2) нагревали–охлаж-

дали в диапазоне температур от 5 до 95°C со скоростью изменения температуры 0.5°C/мин. Оптическую плотность регистрировали при 260, 270 и 300 нм. Температуру плавления комплекса определяли как температуру, соответствующую максимуму первой производной кривой (или профиля) зависимости оптической плотности образца от температуры.

(9-Флуоренил)-метоксикарбонилазид (FmocN_3). (9-Флуоренил)-метоксикарбонилхлорид (1.88 ммоль) растворяли в 10 мл безводного CH_3CN . К раствору добавляли 2.64 ммоль сухого NaN_3 . Полученную суспензию перемешивали 10 ч при нагревании до 40°C. После окончания реакции супернатант отделяли фильтрованием и проводили экстракцию CH_2Cl_2 . Органический слой промывали 1 раз насыщенным солевым раствором, далее 2 раза водой, затем сушили над Na_2SO_4 (безв.). Растворитель удаляли упариванием на ротационном испарителе. Очистку проводили перекристаллизацией из гексана. Для удаления следов воды остаток в колбе дважды упаривали из ацетонитрила.

TCX в системе 85% гексан + 15% CH_2Cl_2 : R_f (FmocCl) = 0.28, R_f (FmocN_3) = 0.08.

^1H -ЯМР (80 МГц, CDCl_3 , *J*, Гц): 7.79 (d, *J* 6.7, 2H), 7.55 (d, *J* 1.7, 2H), 7.42 (t, *J* 4.3, 2H), 7.27 (t, *J* 1.7, 2H), 4.50 (d, *J* 6.3, 2H), 4.31 (t, *J* 7.0, 1H). ИК (cm^{-1}): 3037, 2189, 2135, 1734, 1601, 1448, 1375, 1317, 1240, 1111, 1076, 1030, 982, 922, 864, 621, 563, 482, 424.

5'-Диметокситритил-2'-дезокситимидин-3'-(β -цианэтил)-изопропил]fosfittriэфир (**II**). В пластиковой пробирке с завинчивающейся крышкой к 145 мкл 0.1 М раствора 5'-диметокситритил-2'-дезокситимидин-3'-(β -цианэтил)-(N,N-диизопропил)]амидофосфита (**I**) в CH_3CN (0.01 ммоль) приливали 250 мкл 0.25 М раствора ETT в CH_3CN (0.04 ммоль) и 150 мкл изопропанола (абс.) (2 ммоль). Реакционную смесь перемешивали 5 мин при комнатной температуре. Продукт экстрагировали CH_2Cl_2 , в качестве водной фазы использовали фосфатный буфер (1 М KH_2PO_4 , рН 6.5). Органическую фазу упаривали на ротационном испарителе, сухое вещество растворяли в 500 мкл ацетонитрила. Продукт анализировали методами TCX и ЯМР-спектроскопии и использовали в последующих реакциях без дополнительной очистки.

TCX в системе 90% CH_2Cl_2 + 10% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$: R_f (**I**) = 0.4, R_f (**II**) = 0.36.

^{31}P -ЯМР (32 МГц, CH_3CN): 139.27, 138.88.

5'-Диметокситритил-2'-дезокситимидин-3'-изопропиламинофосфат (**V**). К полученному

фосфиттриэфир (II) (0.01 ммоль) приливали 0.1 М раствор FmocN₃ (0.02 ммоль). Через 5 мин после перемешивания при комнатной температуре реакционную смесь анализировали методами TCX и ЯМР-спектроскопии.

TCX в системе 90% CH₂Cl₂ + 10% C₂H₅OH: R_f (II) = 0.36, R_f (IV) = 0.30.

³¹P-ЯМР (32 МГц, CH₃CN): 5.70, 5.46.

К полученной реакционной смеси добавляли 15 мкл DBU с конечным содержанием основания в системе 2%, выдерживали 5 мин при комнатной температуре, затем анализировали методами TCX и ЯМР-спектроскопии.

TCX в системе 90% CH₂Cl₂ + 10% C₂H₅OH: R_f (IV) = 0.30, R_f (V) = 0.15, 0.10 (в виде двух диастереомеров).

³¹P-ЯМР (32 МГц, CH₃CN): 5.70, 5.46.

Далее раствор экстрагировали CH₂Cl₂, водная фаза – 1 М KH₂PO₄ (pH 6.5). Органическую фазу упаривали на ротационном испарителе. Продукт очищали колоночной хроматографией на силикагеле, подвижная фаза – раствор CH₂Cl₂, содержащий 1% C₂H₅OH и 0.1% (C₂H₅)₃N. Затем проводили масс-спектрометрический анализ ESI (*m/z*): 767.0, m_{теор.} = 766.9 г/моль; m_{эксп.} = 767.0 г/моль.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной работе описан новый подход к синтезу олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих одну или несколько *N*-незамещенных амидофосфатных P-NH₂-модификаций, основанный на использовании 9-(флуоренил)-метоксиарбонилазида (FmocN₃) в рамках реакции окисления P^(III) по классической реакции Штаудингера. Основное преимущество разрабатываемого синтетического подхода – его совместимость с протоколом автоматического твердофазного амидофосфитного синтеза олигонуклеотидов, основанного на использовании стандартных защитных групп и линкеров на поверхности CPG-носителя. Нам, к сожалению, не удалось осуществить высокоэффективный синтез электронейтральных, изоструктурных фосфодиэфирному остатку, производных олигонуклеотидов. При этом предложены условия к получению любых мономодифицированных олигодезоксирибонуклеотидов (с выходами ~80%). Однако это дало возможность детально описать влияние модификации на комплексообразование (–P^(V)–NH₂–)-содержащих производных с ДНК-матрицей с точки зрения термодинамических свойств. Важным аспектом исследования стал тот факт, что амидофосфатная группа, находясь внутри олигонуклеотидной цепи, по-видимому,

имеет возможность формировать неканонические водородные связи, влияя тем самым на распределение структурных форм свободного олигомера и/или его дуплексной формы. При этом такие неканонические взаимодействия с участием Н-донорного (–P^(V)–NH₂–)-остатка не во всех случаях могут содействовать стабилизации комплементарных комплексов ДНК. Кроме того, электронейтральность P-NH₂-группы оказывается обоснованно значимым параметром, определяющим перспективность использования соответствующих изоструктурных аналогов нативных олигонуклеотидов в молекулярно-биологических исследованиях, что было уже неоднократно продемонстрировано ранее [25, 32, 40]. Значимость экспериментально наблюдаемых эффектов, достигаемых при использовании *N*-незамещенных амидофосфатных производных олигонуклеотидов, очевидно, должна возрастать со снижением ионной силы буферной среды, т.е. в условиях роста значимости электростатических взаимодействий биомолекул. В таких условиях P-NH₂-модификация даже может способствовать формированию ДНК-дуплексов. Считаем необходимым в дальнейшем совершенствовать подходы к автоматическому синтезу (–P^(V)–NH₂–)-содержащих олигонуклеотидов – уникальных изоструктурных аналогов природных биополимеров, лишенных в сайте модификации отрицательного заряда фосфодиэфирного звена при сохранении молекулярной массы, поскольку Ar(O) ~ Mr(NH₂) = 16 Да, фрагменты –(OPO(O)(O–))– и –(OPO(O)(NH₂))– в структуре ДНК практически тождественны. Именно это обстоятельство обуславливает целесообразность разработки эффективных методов синтеза и детального изучения свойств P-NH₂-аналогов олигонуклеотидов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность М.А. Баженову за конструктивную критику при планировании экспериментов и обсуждении результатов, а также ОЦКП ИХБФМ СО РАН за масс-спектрометрический анализ олигонуклеотидов и Химическому исследовательскому центру коллективного пользования СО РАН (НИОХ СО РАН) за проведение спектральных и аналитических измерений.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Синтез модифицированных олигонуклеотидов проводили при поддержке Российского научного фонда (грант № 21-64-00017), а исследование их свойств выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, государственное задание ИХБФМ СО РАН № 121031300042-1.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований, выполненных автором данной работы, с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Автор ЕАМ участвовал в разработке и проведении экспериментов, анализе данных и подготовке текста статьи. Авторы ИАП, МИМ участвовали в анализе данных и подготовке текста статьи. Автор ДВП участвовал в разработке методологии, а также в доработке финального варианта текста статьи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Knouse K., Flood D., Vantourout J., Schmidt M., McDonald I., Eastgate M., Baran P. // ACS Cent. Sci. 2021. V. 7. P. 1473–1485.
<https://doi.org/10.1021/acscentsci.1c00487>
2. Benner S., Hurter D. // Bioorg. Chem. 2002. V. 30. P. 62–80.
<https://doi.org/10.1006/bioo.2001.1232>
3. Agrawal S. // Trends Biotechnol. 1996. V. 14. P. 376–387.
[https://doi.org/10.1016/0167-7799\(96\)10053-6](https://doi.org/10.1016/0167-7799(96)10053-6)
4. Duffy K., Arangundy-Franklin S., Holliger P. // BMC Biol. 2020. V. 18. P. 112.
<https://doi.org/10.1186/s12915-020-00803-6>
5. Oberemok V., Laikova K., Repetskaya A., Kenyo I., Gorlov M., Kasich I., Krasnodubets A., Gal'chinsky N., Fomochkina I., Zaitsev A., Bekirova V., Seidosmanova E., Dydik K., Meshcheryakova A., Nazarov S., Smaglyi N., Chelengerova E., Kulanova A., Deri K., Subbotkin M., Useinov R., Shumskykh M., Kubyshkin A. // Molecules. 2018. V. 23. P. 1302.
<https://doi.org/10.3390/molecules23061302>
6. Clavé G., Reverte M., Vasseur J.-J., Smietana M. // RSC Chem. Biol. 2021. V. 2. P. 94–150.
<https://doi.org/10.1039/D0CB00136H>
7. Kandasamy P., Liu Y., Aduda V., Akare S., Alam R., Andreucci A., Boulay D., Bowman K., Byrne M., Cannon M., Chivatakarn O., Shelke J.D., Iwamoto N., Kawamoto T., Kumarasamy J., Lamore S., Lemaitre M., Lin X., Longo K., Looby R., Marappan S., Metterville J., Mohapatra S., Newman B., Paik I.H., Patil S., Purcell-Estabrook E., Shimizu M., Shum P., Standley S., Taborn K., Tripathi S., Yang H., Yin Y., Zhao X., Dale E., Vargeese C. // Nucleic Acids Res. 2022. V. 50. P. 5401–5423.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkac037>
8. Egli M., Manoharan M. // Nucleic Acids Res. 2023. V. 51. P. 2529–2573.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkad067>
9. de la Torre B., Albericio F. // Molecules. 2023. V. 28. P. 1038.
<https://doi.org/10.3390/molecules28031038>
10. Nielsen P. // Mol. Biotechnol. 2004. V. 26. P. 233–248.
<https://doi.org/10.1385/MB:26:3:233>
11. Nielsen P. // Chem. Biodivers. 2010. V. 7. P. 786–804.
<https://doi.org/10.1002/cbdv.201000005>
12. Arangundy-Franklin S., Taylor A., Porebski B., Genna V., Peak-Chew S., Vaisman A., Woodgate R., Orozco M., Holliger P. // Nat. Chem. 2019. V. 11. 533–542.
<https://doi.org/10.1038/s41557-019-0255-4>
13. Peyrottes S. // Nucleic Acids Res. 1996. V. 24. P. 1841–1848.
<https://doi.org/10.1093/nar/24.10.1841>
14. Chubarov A.S., Osorbin I.P., Novikova L.M., Filipenko M.L., Lomzov A.A., Pyshnyi D.V. // Diagnostics. 2023. V. 13. P. 250.
<https://doi.org/10.3390/diagnostics13020250>
15. Dong Z., Chen X., Zhuo R., Li Y., Zhou Z., Sun Y., Liu Y., Liu M. // BMC Biol. 2023. V. 21. P. 95.
<https://doi.org/10.1186/s12915-023-01599-x>
16. Sarkar S. // Biopolymers. 2023. V. 115. P. e23567.
<https://doi.org/10.1002/bip.23567>
17. Lomzov A.A., Kupryushkin M.S., Dyudeeva E.S., Pyshnyi D.V. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2021. V. 47. P. 461–468.
<https://doi.org/10.1134/S1068162021020151>
18. Summerton J. // Int. J. Pept. Res. Ther. 2003. V. 10. P. 215–236.
<https://doi.org/10.1007/s10989-004-4913-y>
19. Bhadra J., Pattanayak S., Sinha S. // Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem. 2015. V. 62. P. 4.65.1–4.65.26.
<https://doi.org/10.1002/0471142700.nc0465s62>
20. Braasch D., Nulf C., Corey D. // Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem. 2002. V. 9. P. 4.11.1–4.11.18.
<https://doi.org/10.1002/0471142700.nc0411s09>
21. Kostov O., Páv O., Rosenberg I. // Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem. 2017. V. 70. P. 4.76.1–4.76.22.
<https://doi.org/10.1002/cpnc.35>
22. Micklefield J. // Curr. Med. Chem. 2001. V. 8. P. 1157–1179.
<https://doi.org/10.2174/0929867013372391>
23. Lee H., Jeon J., Lim J., Choi H., Yoon Y., Kim S. // Org. Lett. 2007. V. 9. P. 3291–3293.
<https://doi.org/10.1021/ol071215h>
24. Купрюшкин М.С., Пышный Д.В., Стеценко Д.А. // Act. Nat. 2014. Т. 6. С. 116–118.
<https://doi.org/10.32607/20758251-2014-6-4-116-118>

25. *Kuznetsov N.A., Kupryushkin M.S., Abramova T.V., Kuznetsova A.A., Miroshnikova A.D., Stetsenko D.A., Pyshnyi D.V., Fedorova O.S.* // *Mol. Biosyst.* 2016. V. 12. P. 67–75.
<https://doi.org/10.1039/c5mb00692a>
26. *Новопашина Д.С., Назаров А.С., Воробьева М.А., Купрюшкин М.С., Давыдова А.С., Ломзов А.А., Пышный Д.В., Altman S., Веньяминова А.Г.* // *Мол. биология.* 2018. Т. 52. С. 1045–1054.
<https://doi.org/10.1134/S0026898418060137>
27. *Garafutdinov R.R., Sakhabutdinova A.R., Kupryushkin M.S., Pyshnyi D.V.* // *Biochimie.* 2020. V. 168. P. 259–267.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.11.013>
28. *Markov A.V., Kupryushkin M.S., Goncharova E.P., Amirkhanov R.N., Vasilyeva S.V., Pyshnyi D.V., Zenkova M.A., Logashenko E.B.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2019. V. 45. P. 774–782.
<https://doi.org/10.1134/S1068162019060268>
29. *Chubarov A.S., Oscorbin I.P., Filipenko M.L., Lomzov A.A., Pyshnyi D.V.* // *Diagnostics.* 2020. V. 10. P. 872.
<https://doi.org/10.3390/diagnostics10110872>
30. *Pavlova A.S., Yakovleva K.I., Epanchitseva A.V., Kupryushkin M.S., Pyshnaya I.A., Pyshnyi D.V., Ryabchikova E.I., Dovydenco I.S.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. P. 9784.
<https://doi.org/10.3390/ijms22189784>
31. *Kupryushkin M.S., Filatov A.V., Mironova N.L., Patutina O.A., Chernikov I.V., Chernolovskaya E.L., Zenkova M.A., Pyshnyi D.V., Stetsenko D.A., Altman S., Vlassov V.V.* // *Mol. Ther. Nucleic Acids.* 2022. V. 27. P. 211–226.
<https://doi.org/10.1016/j.omtn.2021.11.025>
32. *Stetsenko D., Kupryushkin M., Pyshnyi D.* // *Int. Application WO2016028187A1*, 2016.
33. *Froehler B.* // *Tetrahedron Lett.* 1986. V. 27. P. 5575–5578.
[https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)85269-7](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)85269-7)
34. *Iyer R., Devlin T., Habus I., Yu D., Johnson S., Agrawal S.* // *Tetrahedron Lett.* 1996. V. 37. P. 1543–1546.
[https://doi.org/10.1016/0040-4039\(96\)00067-6](https://doi.org/10.1016/0040-4039(96)00067-6)
35. *Peyrottes S., Vasseur J.-J., Imbach J., Rayner B.* // *Tetrahedron Lett.* 1996. V. 37. P. 5869–5872.
[https://doi.org/10.1016/0040-4039\(96\)01250-6](https://doi.org/10.1016/0040-4039(96)01250-6)
36. *Laurent A., Debart F., Rayner B.* // *Tetrahedron Lett.* 1997. V. 38. P. 5285–5288.
[https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(97\)01153-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(97)01153-2)
37. *Devlin T., Iyer R., Johnson S., Agrawal S.* // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1996. V. 6. P. 2663–2668.
[https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(96\)00498-2](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(96)00498-2)
38. *Peyrottes S., Vasseur J.-J., Imbach J.L., Rayner B.* // *Nucleosides and Nucleotides.* 1997. V. 16. P. 1551–1554.
<https://doi.org/10.1080/07328319708006227>
39. *Iyer R., Yu D., Devlin T., Ho N.-H., Johnson S., Agrawal S.* // *Nucleosides and Nucleotides.* 1997. V. 16. P. 1491–1495.
<https://doi.org/10.1080/07328319708006214>
40. *Стеценко Д.А., Купрюшкин М.С., Пышный Д.В.* // *Заявка RU2014134383A*, 2014.
41. *Paul S., Roy S., Monfregola L., Shang S., Shoemaker R., Caruthers M.* // *J. Am. Chem. Soc.* 2015. V. 137. P. 3253–3264.
<https://doi.org/10.1021/ja511145h>
42. *Prokhorova D.V., Chelobanov B.P., Burakova E.A., Fokina A.A., Stetsenko D.A.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2017. V. 43. P. 38–42.
<https://doi.org/10.1134/S1068162017010071>
43. *Chelobanov B.P., Burakova E.A., Prokhorova D.V., Fokina A.A., Stetsenko D.A.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2017. V. 43. P. 664–668.
<https://doi.org/10.1134/S1068162017060024>
44. *Kupryushkin M.S., Zharkov T.D., Ilina E.S., Markov O.V., Kochetkova A.S., Akhmetova M.M., Lomzov A.A., Pyshnyi D.V., Lavrik O.I., Khodyreva S.N.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2021. V. 47. P. 719–733.
<https://doi.org/10.1134/S1068162021030110>
45. *Carpino L., Han G.* // *J. Org. Chem.* 1972. V. 37. P. 3404–3409.
<https://doi.org/10.1021/jo00795a005>
46. *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>
47. *Jiménez E.I., Gibard C., Krishnamurthy R.* // *Angew. Chemie Int. Ed.* 2021. V. 60. P. 10775–10783.
<https://doi.org/10.1002/anie.202015910>
48. *Preobrazhenskaya N.N.* // *Russ. Chem. Rev.* 1972. V. 41. P. 54–65.
<https://doi.org/10.1070/RC1972v04n01ABEH002030>
49. *Johnsson R., Bogojeski J., Damha M.* // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2014. V. 24. P. 2146–2149.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.03.032>
50. *Gololobov Y.G., Zhmurova I.N., Kasukhin L.F.* // *Tetrahedron.* 1981. V. 37. P. 437–472.
[https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)92417-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)92417-2)
51. *Jones A.* // *Int. J. Biol. Macromol.* 1979. V. 1. P. 194–207.
[https://doi.org/10.1016/0141-8130\(79\)90013-8](https://doi.org/10.1016/0141-8130(79)90013-8)
52. *Boal J., Wilk A., Harindranath N., Max E., Kempe T., Beauchage S.* // *Nucleic Acids Res.* 1996. V. 24. P. 3115–3117.
<https://doi.org/10.1093/nar/24.15.3115>
53. *Pyshnyi D.V., Lomzov A.A., Pyshnaya I.A., Ivanova E.M.* // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2006. V. 23. P. 567–579.
<https://doi.org/10.1080/07328319708006227>
54. *Преч Э., Бюльманн Ф., Аффольтер К.* // *Определение строения органических соединений. Таблицы спектральных данных.* Москва: Мир, 2006. 439 с.

Adaptation of a Protocol for the Automated Solid-Phase Phosphoramidite Synthesis of Oligodeoxyribonucleotides for the Preparation of Their *N*-Unsubstituted Phosphoramidate Analogues (P-NH₂)

E. A. Malova^{*, #}, I. A. Pyshnaya^{*, #}, M. I. Meschaninova^{*}, and D. V. Pyshnyi^{*}

[#]Phone/fax: +7 (383) 363-51-36; e-mail: malova.ev.an@gmail.com, pyshnaya@niboch.nsc.ru

^{*}Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, prosp. Acad. Lavrentyeva 8, Novosibirsk, 630090 Russia

A new approach to the automated synthesis of *N*-unsubstituted phosphoramidate oligodeoxyribonucleotides (P-NH₂) based on an optimized solid-phase phosphoramidite protocol using the Staudinger reaction has been proposed. The rapid and efficient oxidation of model P^(III)-containing phosphite triethers by the organic azide (9*H*-fluoren-9-yl)methylcarbonylazide (FmocN₃) to the corresponding phosphamides –(OPO(OR)–(NFmoc))–, where R is a residue of nucleoside or alkyl nature, has been demonstrated. Removal of the alkaline-labile fluorenyl group from the modified internucleoside linkage allows the production of electro-neutral, under physiological conditions of pH ~7, *N*-unsubstituted phosphoramidate (–(OPO(O)(NH₂))– or (P-NH₂)) residues in the oligonucleotide chain instead of the classical negatively charged phosphodiester (–(OPO(O)(O)(O[–]))– or (P-O)) residues. In optimizing the synthetic protocol, it has been demonstrated that to improve the efficiency of P-NH₂-oligonucleotide synthesis, it is necessary to include an additional Fmoc-group cleavage step in the automatic synthesis protocol after each oxidation step of the growing oligomer chain via the Staudinger reaction. An almost complete absence of dependence of the P-NH₂-oligonucleotide yield on both the localization of the P-NH₂-strand in the chain and the type of dinucleotide fragment being modified was shown. A set of mono- and bis-modified octadeoxyribonucleotides was obtained, and a detailed study of the thermal stability of complementary DNA/DNA complexes under different buffer conditions was performed. It was shown that under high ionic strength conditions (1 M NaCl, pH 7.2), the introduction of a single P-NH₂ strand reduced the thermostability of the DNA complex by an average of 1.3°C. When the ionic strength of the solution decreases, the destabilizing effect of the P-NH₂-modification decreases significantly, which further confirms the electroneutral status of the introduced phosphoramidate linkage. Thus, we have developed a protocol for the preparation of partially modified oligonucleotide derivatives bearing uncharged but isostructured to native P-O-strands – phosphoramidate residues P-NH₂.

Keywords: phosphoramidate derivatives of oligodeoxyribonucleotides, automated synthesis, Staudinger reaction, synthesis protocol optimization