

На правах рукописи

Брылёв Владимир Анатольевич

**Разработка подходов к синтезу разветвлённых функциональных
олигонуклеотидных конъюгатов**

1.4.9 – БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва – 2024

Работа выполнена в Лаборатории молекулярного дизайна и синтеза Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Научный руководитель: **Коршун Владимир Аркадьевич**, доктор химических наук

Официальные оппоненты: **Завьялова Елена Геннадьевна**, доктор химических наук, доцент кафедры природных соединений химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Новопашина Дарья Сергеевна, кандидат химических наук, доцент, старший научный сотрудник лаборатории химии РНК, заместитель директора Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН)

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН)

Защита состоится «18» декабря 2024 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Государственном научном центре Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ГНЦ ИБХ РАН) по адресу: 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНЦ ИБХ РАН и на сайте института www.ibch.ru

Автореферат разослан « » 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор физико-математических наук



В.А. Олейников

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Работа Брылёва В.А., изложенная в его диссертации «Разработка подходов к синтезу разветвлённых функциональных олигонуклеотидных конъюгатов», посвящена актуальной проблеме современной науки – разработке биоортогональных высокоэффективных подходов, позволяющих получать разветвлённые олигонуклеотидные конъюгаты. Тема работы актуальна, т.к. разработанные новые подходы синтеза разветвлённых олигонуклеотидных конъюгатов значительно расширяют возможности их применения в таких направлениях, как ДНК-нанотехнологии, разработка терапевтических аптамерных и олигонуклеотидных конъюгатов, получение диагностических инструментов на базе ковалентных разветвленных олигонуклеотидных конъюгатов.

Наиболее интересной моделью для прикладного применения выступают разветвленные конъюгаты аптамеров с ферментативно-отщепляемым цитостатическим агентом монометилауристатином E (ММАЕ). Разработан общий подход к синтезу конъюгатов олигонуклеотид–ММАЕ различной стехиометрии с ферментативно расщепляемой полезной нагрузкой. Метод основан на двухшаговом клик-подходе. На первом этапе алкин-модифицированные олигонуклеотиды легко трансформируются в азидные производные посредством клик-реакции с ди- или тетраазидом в растворе. Полученные азидо-модифицированные олигонуклеотиды/аптамеры затем реагируют с алкин-модифицированным производным ММАЕ, содержащим расщепляемый ферментом линкер. Разветвленные и линейные конъюгаты EGFR-таргетирующего аптамера GR20 были получены и протестированы на различных линиях раковых клеток.

Цель работы и задачи исследования. Разработка методологии биоортогональных способов синтеза разветвлённых функциональных конъюгатов, в том числе олигонуклеотид-олигонуклеотидных. Для достижения поставленной цели предполагалось решение следующих задач:

1. Химический синтез ряда разветвляющих гидрофильных реагентов на основе пентаэритрита, содержащих от двух до четырех азидо-групп, способных вступать в биоортогональную медь(I)-катализируемую реакцию азид-алкинового циклоприсоединения. Характеризация полученных реагентов.

2. Отработка условий биортогональной клик-реакции, анализа и разделения разветвляющих реагентов. Поиск оптимальных значений концентраций реагирующих реагентов, их соотношения, времени реакции, а также подбор условий хроматографического и электрофоретического разделения образующихся продуктов.

3. Подбор условий твердофазной клик-реакции между азидом и алкин-модифицированными олигонуклеотидами для синтеза конъюгатов, содержащих разветвленные кластеры N-ацетилгалактозамина.

4. Синтез модифицированных олигонуклеотид-олигонуклеотидных конъюгатов на основе аптамеров, содержащих ферментативно-отщепляемое противоопухолевое соединение – монометилауристатин E.

Поскольку основным содержанием диссертации была разработка биортогональных способов синтеза разветвленных олигонуклеотидных конъюгатов, в литературном обзоре рассмотрены вопросы дизайна и синтеза разветвляющих реагентов, а так же их применение в создании разветвленных олигонуклеотидных конъюгатов синтетическими и постсинтетическими методами.

Научная новизна и практическая значимость работы. Методы получения олигонуклеотид-олигонуклеотидных конъюгатов разнообразны, но наиболее трудными задачами оказываются контроль стехиометрии и простота выделения конечных целевых конъюгатов. Впервые получен гидрофильный тетраазид и показано его успешное применение в качестве ковалентного разветвляющего реагента. Разветвляющий реагент должен быть гидрофильным, содержать функциональные группы, подходящие для биортогонального конъюгирования. Разработанные новые подходы синтеза позволяют получать олигонуклеотид-

олигонуклеотидные конъюгаты, в том числе модифицированные флуоресцентными красителями, кластерами N-ацетилгалактозамина, или ферментативно-отщепляемыми производными цитостатического агента монометилаурицидина Е. Стехиометрия конъюгатов регулируется соотношением реагентов; целевые продукты разделяются и очищаются с помощью электрофореза в полиакриламидном геле или высокоэффективной жидкостной хроматографией за счёт значительного отличия в молекулярной массе и заряде. Разработан принцип дизайна «наномономеров», способных вступать в реакцию перегибридации по механизму замещения последовательностей с образованием циклического тетрамера, простейшей динамической ДНК-наноструктуры. Впервые показано протекание мезо-реакции с образованием тетрамерной структуры из пары наномономеров.

Практическая значимость данной работы заключается в следующем: разработанный способ синтеза разветвленных олигонуклеотидных конъюгатов позволяет практически исключить ошибки в последовательностях крупных конъюгатов, которые чаще всего оказываются делециями; разработанный подход сборки простых дискретных ДНК-наноструктур может использоваться для создания более сложных динамических супрамолекулярных конструкций на основе ДНК; способ синтеза N-ацетилгалактозаминовых кластеров открывает более простой путь к синтезу олигонуклеотидных конъюгатов с таргетирующими GalNAc-кластерами; подход создания аптамерных конъюгатов с ферментативно-отщепляемой нагрузкой в виде цитостатического агента позволяет синтезировать простым и эффективным способом цитотоксические конъюгаты.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Разработаны и синтезированы линкерные реагенты на основе производных пентаэритрита, содержащие несколько азидогрупп. Реагенты могут успешно применяться для биоортогонального азид-алкинового циклоприсоединения к алкин-модифицированным олигонуклеотидам.
2. Отработаны методы сборки конъюгатов, позволяющие регулировать стехиометрию конъюгатов варьируя соотношения разветвленного полиазидного реагента и вступающего в реакцию алкинсодержащего олигонуклеотида. Постсинтетический подход, по сравнению с методом сборки разветвленных конъюгатов во время синтеза, позволяет избежать накопления делетированных продуктов. Значительное различие по заряду и молекулярной массе продуктов одной реакции позволяет разделять реакционные смеси с высоким разрешением.
3. Гибридизация пары разветвленных олигонуклеотидных конъюгатов даёт простейшие дискретные ДНК-наноструктуры (димеры) в оптимизированных условиях – этилендиамин-содержащий буфер на основе морфолинэтансульфокислоты с мгновенным охлаждением и начальной концентрацией конъюгатов 0.5 мкМ.
4. Разработан дизайн ДНК-наномономеров, представляющих собой димер с одноцепочечным фрагментом. В паре наномономеров дуплексные и одноцепочечные фрагменты подобраны таким образом, что при их смешивании спонтанно протекает реакция по механизму замещения последовательности с образованием более сложной структуры – тетрамера.
5. Твердофазная реакция медь-катализируемого азид-алкинового циклоприсоединения протекает с образованием продукта моно-присоединения (олигонуклеотидного конъюгата с тремя азидогруппами). Последующая клик-реакция алкинсодержащих производных N-ацетилгалактозамина по трем азидогруппам приводит к образованию конъюгатов с разветвленными GalNAc-кластерами.
6. Получен ряд разветвленных конъюгатов на основе EGFR-специфического аптамера, содержащих в своем составе от 1 до 3 молекул противоопухолевого соединения монометилаурицидина Е. Конъюгаты обладают цитотоксическим действием

Личный вклад автора. Основные результаты получены лично автором или при его непосредственном участии под руководством д.х.н., зав. лаб. молекулярного дизайна и синтеза Коршуна В.А. и при взаимодействии с коллегами по лаборатории. Личный вклад автора за-

ключается в непосредственном участии в выборе направления научной работы, разработке цели и задач исследования по теме диссертационной работы. Автор разрабатывал методы синтеза как низкомолекулярных соединений, так и олигонуклеотидных конъюгатов, проводил выделение и очистку конъюгатов, анализировал данные по физико-химическим характеристикам веществ (интерпретировал масс-спектры, спектры ЯМР), проводил спектральные исследования полученных соединений (спектры поглощения и флуоресценции), а также участвовал в написании и подготовке к публикации статей и тезисов докладов на научных конференциях по результатам исследования. Кроме результатов автора, в работе были использованы экспериментальные данные, полученные в других лабораториях и в рамках научного сотрудничества с другими организациями: ФГАУ «НМИЦ нейрохирургии им. ак. Н.Н. Бурденко» Минздрава России (Г.В. Павлова, Н.С. Самойленкова и др.), Сколковским институтом науки и технологий (Т.С. Зацепин и др.), Институтом физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси (В.В. Шманай, Ю.В. Мартыненко-Макаев и др.), Федеральным научно-клиническим центром физико-химической медицины ФМБА (Д.В. Клинов, В.Б. Цветков, Н.А. Баринов), МГУ им. М.В. Ломоносова (Д.А. Гвоздев и др.), ИБХ РАН (Рябухина Е.В., Д.Ю. Рязанцев и др.). Работа выполнена при поддержке Минобрнауки РФ (проект № 075-15-2024-561).

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены на V Всероссийской конференции «Физико-химическая биология» (9–12 июля, 2024, Новосибирск); V Междисциплинарной конференции «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии» (15–18 сентября, 2019, Судак); IV междисциплинарном симпозиуме по медицинской, органической, биологической химии и фармацевтике (23–26 сентября, 2018, Новый Свет, Крым); V Всероссийской с международным участием конференции по органической химии (10–14 сентября, 2018, Владикавказ, Россия); на XXVII и XXIX зимних молодёжных научных школах «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (8–11 февраля 2016 и 7–10 февраля 2017, Москва); XXII International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids (July 18–22, 2016, Paris, France).

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 108 страницах и состоит из введения, обзора литературы, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов, списка цитируемой литературы, включающего 283 ссылки. Диссертация содержит 58 рисунков, 8 схем и 3 таблицы.

Публикации. По материалам работы опубликовано 6 статей в международных рецензируемых журналах и 10 тезисов докладов на научных конференциях и симпозиумах.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Разветвляющие реагенты на основе пентаэритрита

На основе пентаэритрита **1** синтезированы разветвляющие реагенты **6**, **7** и **8**, несущие две, три и четыре азидогруппы, соответственно (Схема 1). В качестве побочного продукта выделен и охарактеризован азидоспирт **5**, который не использовался в данной работе. Его применение в качестве гидрофилизатора липофильных соединений показано в работе. Проведение превращений **1**→**2**→**3**→**4** в описанных литературных условиях давало в наших руках неудовлетворительные результаты, поэтому методики были модифицированы. Ключевой тетраол **4** получен с помощью модифицированной трёхстадийной методики синтеза.

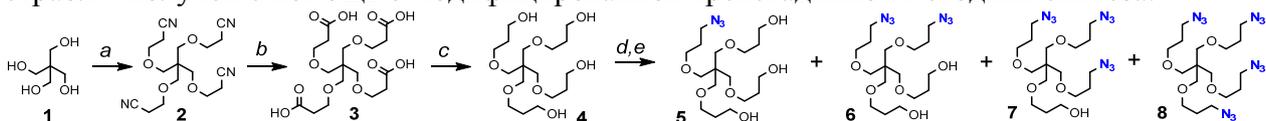


Схема 1. Синтез разветвленных полиазидов. *a)* акрилонитрил/ТВАН/вода, кт, 24 ч, 65%; *b)* HCl конц., 80°C, 4 ч, 95%; *c)* BMS/THF, 50°C, 1 ч, 67%; *d)* MsCl/Et₃N/DCM; *e)* NaN₃/DMSO, 48 ч.

Спирт **4** мезилировали тремя молями мезилхлорида, а затем полученную смесь мезилатов обрабатывали избытком азидата натрия в DMSO. Смесь азидов **5–8** (Схема 1) разделяли

колоночной хроматографией на силикагеле. Выходы чистых соединений **6–8** составили 8%, 29% и 26% соответственно.

При необходимости смещения состава продуктов реакции в сторону менее замещенных азидов, избыток мезилхлорида по отношению к тетраолу **4** на стадии *d* (Схема 1) может быть уменьшен до значения 1.2. В таком случае последующее нуклеофильное замещение избытком азидата натрия приводит к образованию соединений **5** и **6** с выходами 32% и 27% соответственно. Избыточное мезилирование тетраола **4** с последующим нуклеофильным замещением азидом натрия приводит к образованию тетраазида **8** с выходом 90%.

Синтез разветвлённых олигонуклеотид-олигонуклеотидных конъюгатов

Азиды **6–8** легко вступают в медь-катализируемую реакцию азид-алкинового циклоприсоединения (клик-реакцию) с алкин-модифицированными олигонуклеотидами в водно-органическом растворе. Оптимальные условия реакции – значения начальных концентраций алкин-модифицированных олигонуклеотидов не ниже 200 мкМ, концентрации меди(I) и аскорбиновой кислоты более 1мМ, при этом время реакции составляет несколько часов. Стехиометрия олигонуклеотид-олигонуклеотидных конъюгатов может варьироваться избытком алкин-модифицированного олигонуклеотида. Получаемые продукты анализировались и препаративно разделялись с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на обращенной фазе, а также с помощью денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ). Такой подход предполагает неограниченные возможности синтеза симметричных (гомогенных) и несимметричных (гетерогенных) разветвленных олигонуклеотид-олигонуклеотидных конъюгатов. Гетерогенные олигонуклеотид-олигонуклеотидные конъюгаты могут включать в свой состав несколько разных олигонуклеотидов, либо олигонуклеотиды и флуоресцентный краситель.

Были изучены условия клик-реакции с использованием модельного олигонуклеотида T₁₀. Конъюгация алкин-модифицированного олигонуклеотида с азидными реагентами **7** и **8** привела к образованию набора продуктов. Анализ реакционных смесей проводили в денатурирующем 19% ПААГ (Рис. 1). Соотношение продуктов в реакционных смесях варьировалось избытком алкин-модифицированного олигонуклеотида T₁₀ по отношению к триазиду **7** (Рис. 1А) и тетраазиду **8** (Рис. 1В).

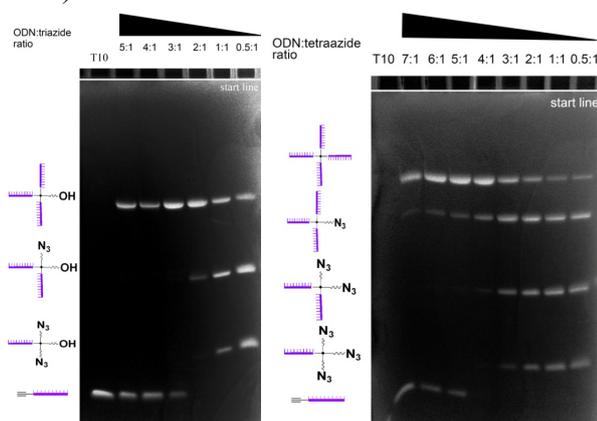


Рис. 1. Анализ в денатурирующем 19% ПААГ реакций конъюгации олигонуклеотида T₁₀ с триазидом **7** (А) и тетраазидом **8** (В) в различных соотношениях.

Продукты мигрируют в зависимости от количества олигонуклеотидов в составе конъюгата – чем больше олигонуклеотидных звеньев содержит блок, тем медленнее он движется в геле. Как видно из изображений (Рис. 1), продукты полного присоединения (трис- или тетра-кис-) образуются при любом соотношении разветвляющего реагента и олигонуклеотида. В реакции доминирует трис-продукт триазида **7**, начиная с соотношения 2:1, и становится единственным продуктом при соотношении 3:1 и выше.

Тетрапродукт тетраазида **8** становится основным при соотношении алкин-модифицированного олигонуклеотида к тетраазиду 4:1. Однако следовые количества трис-продукта присутствуют всегда, даже при более высоких избытках олигонуклеотида.

Выходы выделенных продуктов триазида **7** (соотношение олигонуклеотид : реагент, 2 : 1) после элюирования из геля составляли: 12% трис-продукта, 11% бис-продукта, 5% моно-продукта, а для тетраазида **8** (соотношение олигонуклеотид : реагент, 3 : 1): 8% тетракис-продукта, 11% трис-продукта, 9% бис-продукта, 3% моно-продукта. Выходы элюции конъюгатов из геля зависят от степени замещения разветвляющего реагента.

Частичное присоединение олигонуклеотидов к разветвляющим реагентам **7** и **8** более привлекательно, чем полное присоединение ко всем доступным азидо-группам, так как открывает возможность дальнейшей модификации остаточных азидо-групп другими заместителями с получением несимметричных гетерогенных блоков.

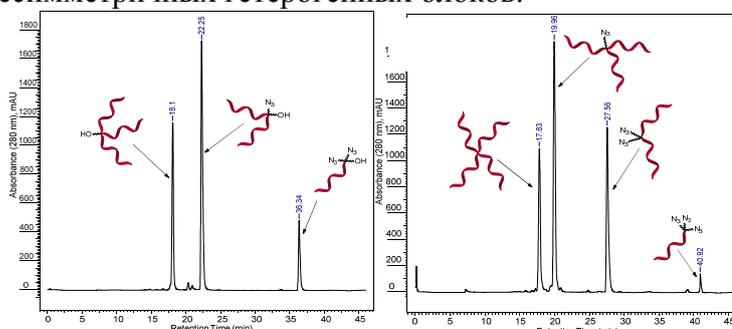


Рис. 2. ВЭЖХ-профили частичной функционализации азидов **7** (А) и **8** (В) олигонуклеотидом T₁₀ в соотношениях 2 : 1 и 3 : 1, соответственно.

Путем снижения соотношения олигонуклеотида к полиазиду с 5 до 2 для реагента **7** и соотношения с 7 до 3 для реагента **8**, можно получить образование продуктов с одной или несколькими незатронутыми азидо-группами. Разделение реакционной смеси может проводиться с помощью ВЭЖХ (Рис. 2) со значительно более высоким выходом по сравнению с денатурирующим электрофорезом: 32% трис-продукта, 52% бис-продукта, 16% моно-продукта из триазида **7** (Рис. 2А – соотношение 2:1) и 25% тетракис-продукта, 42% трис-продукта, 28% бис-продукта, 5% моно-продукта из тетраазида **8** (Рис. 2В – соотношение 3:1).

Каждый пик с препаративной ВЭЖХ и каждая полоса с препаративного электрофореза в ПААГ были выделены, и их состав был подтвержден методом ВЭЖХ-МС. Наличие свободных азидо-групп в выделенных продуктах неполного присоединения позволило синтезировать несимметричные гетерогенные разветвленные конъюгаты на основе азидов **7** и **8** (Схема 2).

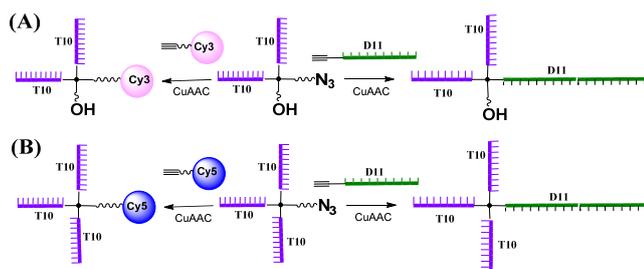


Схема 2. Дальнейшая модификация частично функционализированных разветвленных олигонуклеотид-олигонуклеотидных конъюгатов из триазида **7** (А) и тетраазида **8** (В).

Модельные эксперименты показали, что азидогруппы способны к дальнейшей конъюгации после первой клик-реакции и выделения с помощью ВЭЖХ. Проведены реакции мечення флуоресцентными алкиновыми производными цианиновых красителей Cy3 и Cy5. Реакции проходили с высокой степенью конверсии более 95%.

Аналогичные реакции были проведены для присоединения алкин-модифицированного олигонуклеотида с другой последовательностью к свободным азидо-группам разветвленных конъюгатов олигонуклеотида T₁₀. Блоки, несущие одну свободную азидо-группу, прореагировали с 5'-алкин-модифицированным олигонуклеотидом **D11** (GGTCGCTTATCTGCACTCGGA) в тех же условиях, что и синтез исходных разветвленных конъюгатов (Схема 2).

Исследование продуктов реакции проводили в денатурирующем 15% ПААГ (Рис. 3). Формирование несимметричных гетерогенных блоков подтверждается появлением новой полосы мигрирующей медленнее, чем все полосы исходных олигонуклеотида и блоков.

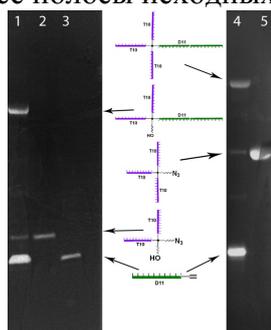


Рис. 3. Анализ в 15% ПААГ реакционных смеси из синтеза несимметричных гетерогенных конъюгатов олигонуклеотидов T₁₀ и D11 с помощью клик-реакции с азидо-содержащими конъюгатами. (1) – клик реакция 21-мерного олигонуклеотида D11 с азидной группой дипродукта из триазида **7**, (2) – исходный ди- продукт, (3) – исходный D11, (4) – клик реакция D11 по азидной группе трипродукта из тетраазида **8**, (5) – исходный трипродукт.

Получаемые несимметричные гетерогенные конъюгаты были разделены в денатурирующем ПААГ и очищены для дальнейшей характеристики с помощью масс-спектрометрии. Оценочный выход несимметричных гетерогенных блоков составлял 29% для конъюгата на основе триазида **7** и 9% для конъюгата из тетраазида **8** после элюирования из геля. Конъюгаты имеют тетраэдрическую точку разветвления и гидроксипропильные линкеры, обеспечивающие гибкость в процессе гибридизации конъюгатов на основе разветвляющих реагентов.

Таким образом, возможность контроля стехиометрии строительных блоков открывает большие перспективы для синтеза и сборки несимметричных гетерогенных разветвленных конъюгатов, применяемых в разнообразных функциональных наноконструкциях. Промежуточные азидо-содержащие производные, а также продукты, меченые цианиновыми красителями, можно легко выделить и очистить с помощью ВЭЖХ. В то же время денатурирующий электрофорез в ПААГ – оптимальный метод для выделения олигонуклеотид-олигонуклеотидных конъюгатов различной стехиометрии, например, [2+1] и [3+1]. Очевидно, что в случае необходимости достаточно просто могут быть получены конъюгаты другого состава, в частности, [1+1+1], [2+2], [2+1+1] и [1+1+1+1].

Гомогенные олигонуклеотидные конъюгаты из диазида и сборка простой наноструктуры на их основе

Для получения гомогенных олигонуклеотид-олигонуклеотидных конъюгатов на основе диазида **6** (Схема 3) были подобраны условия, позволяющие проводить клик-реакцию в высокой конверсии по двум азидогруппам.

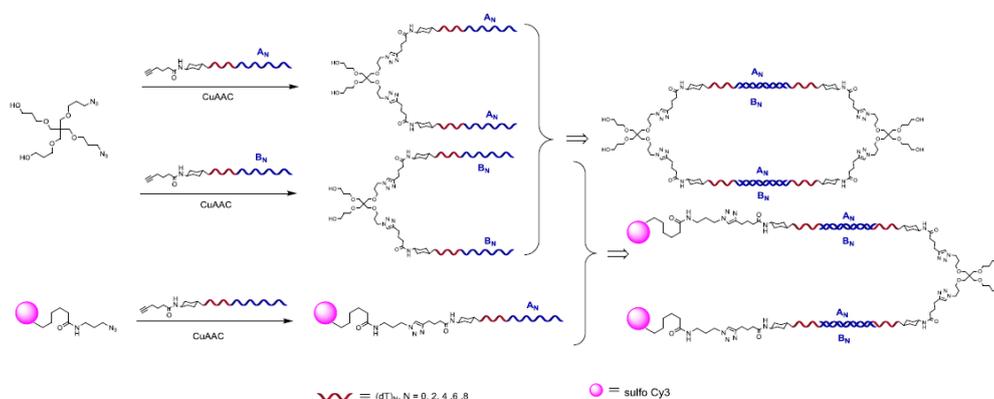


Схема 3. Синтез конъюгатов на основе диазида **6** и их сборка в «нанозетиле»; гибридизация сульфо-Су3-меченых олигонуклеотидов с гомогенными конъюгатами на основе диазида **6**. Красным цветом выделена негибридуемая олиго-Т часть.

Оптимизированные условия клик-реакции (начальная концентрация алкин-модифицированного олигонуклеотида 200 мкМ, соотношение алкин : азид, 3 : 1, время реакции – 4 ч) позволяют получать гомогенные конъюгаты с высокой конверсией. Выходы выделенных конъюгатов составляли около 50% (в пересчете на исходный диазид) с полной конверсией азидов. Аналитический электрофорез реакционных смесей показал отсутствие моно-модифицированных промежуточных продуктов (Рис. 4).

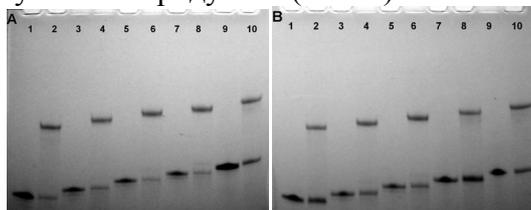


Рис. 4. Аналитический денатурирующий 14%-ный ПААГ реакционных смесей, (А) дорожки 1, 3, 5, 7, 9 – исходные алкин-модифицированные олигонуклеотиды (А1, А2, А3, А4, А5), дорожки 2, 4, 6, 8, 10 – реакционные смеси, содержащие продукты (А1)₂, (А2)₂, (А3)₂, (А4)₂, (А5)₂; (Б) дорожки 1, 3, 5, 7, 9 – алкин-модифицированные олигонуклеотиды (В1, В2, В3, В4, В5), дорожки 2, 4, 6, 8, 10 – реакционные смеси, содержащие продукты (В1)₂, (В2)₂, (В3)₂, (В4)₂, (В5)₂.

Кроме того, олигонуклеотиды А1, А2, А3, А4 и А5 были помечены по 5'-концу азидом красителя сульфо-Су3 с помощью CuAAC (Схема 3).

Денатурирующий электрофорез использовался также для препаративного выделения продуктов. Чистота и состав синтезированных конъюгатов, а также вспомогательных Су3-меченых олигонуклеотидов были подтверждены с помощью ВЭЖХ, аналитического электрофореза в ПААГ (Рис. 5) и масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением.

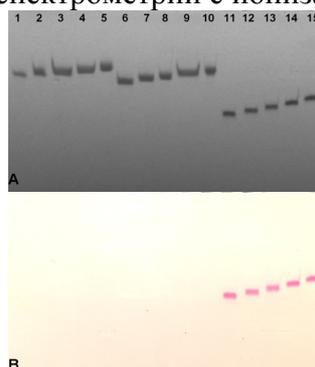


Рис. 5. Аналитический денатурирующий электрофорез в 14%-ном ПААГ очищенных олигонуклеотид-олигонуклеотидных конъюгатов. (А) – Визуализация в УФ-области, дорожки с 1 по 10 содержат чистые конъюгаты (А1)₂, (А2)₂, (А3)₂, (А4)₂, (А5)₂, (В1)₂, (В2)₂, (В3)₂, (В4)₂, (В5)₂; дорожки 11–15 содержат меченные 5'-сульфо-Су3-меченные олигонуклеотиды А1, А2, А3, А4, А5. (В) – Тот же гель в видимом свете, дорожки 11–15 содержат 5'-сульфо-Су3-меченные олигонуклеотиды А1, А2, А3, А4, А5.

Синтез V-образных гомогенных конъюгатов (ОДН)₂ путем циклоприсоединения алкин-модифицированных олигонуклеотидов к диазиду **6** и их сборка в наноэтилен показаны на Схеме 3.

Гибкость линкеров может значительно влиять на выход сборки ДНК-наноструктур, так как высокая жесткость в области точки ветвления может создавать стерические затруднения, в то время как увеличение гибкости может снизить селективность сборки.

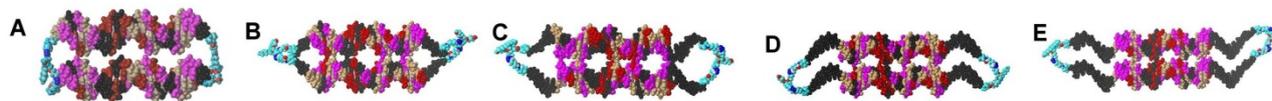


Рис. 6. Молекулярные модели ДНК-наноэтиленов: (А) (А1)₂-(В1)₂; (В) (А2)₂-(В2)₂; (С) (А3)₂-(В3)₂; (D) (А4)₂-(В4)₂; и (Е) (А5)₂-(В5)₂. Нуклеотиды: Т-черный, С-пурпурный, G-серый, А-красный; атомы в линкерах: сине-зеленый – водород, углеродные – белый, азот – синий, кислород – красный.

Для проверки возможности образования димеров типа «наноэтилен» выполнили молекулярное моделирование (Рис. 6) с визуализацией трехмерного расположения двухцепочечных фрагментов в димере типа $(AN)_2-(BN)_2$. Анализ моделей показал, что даже пара $(A1)_2-(B1)_2$ с отсутствующими негибридирующимися линкерами T_n может образовывать наноэтилен (Рис. 6А).

В димерной наноструктуре $(A1)_2-(B1)_2$ (Рис. 6А) один из 1,2,3-триазолов участвует в π - π -стэкинге с близлежащим остатком цитозина, а другой – с близлежащим остатком аденина на противоположной стороне наноструктуры. Оптимальная ориентация линкера и его длина предполагает существование только одного такого π - π -взаимодействия на каждой стороне димера. Определена оптимальная ориентация линкера с относительным расположением двух спиралей ДНК – Y-оси пар нуклеотидов, прилегающих к линкеру, с каждой стороны димера параллельны. Модель $(A2)_2-(B2)_2$ показывает, что добавление линкера T_2 в негибридирующуюся часть рядом с линкером изменяет взаимное положение двух ДНК спиралей. Две комплементарные пары нуклеотидов соединенные с линкером, находятся ближе друг к другу из-за изменения угла между двумя Y-осями примерно на 90 градусов. Дальнейшее расширение моделей до T_4 , T_6 и T_8 демонстрирует оптимальную ориентацию линкера путем вращения двух спиралей ДНК вокруг оси Z. Из-за повышенной гибкости, взаимные ориентации негибридирующихся концов могут быть одинаковыми (Рис. 6D,E) или разными (Рис. 6C).

Поскольку, исходя из моделирования, все эти наноструктуры могут быть стабильными, мы провели экспериментальное исследование по поиску оптимальных условий для сборки структур типа «наноэтилен». Оптимизированы условия реакции гибридизации варьированием состава буфера, скорости охлаждения и начальных концентраций V-образных блоков. Анализ электрофорезом в ПААГ гибридизационных смесей приведен на Рис. 7 и Рис. 8.

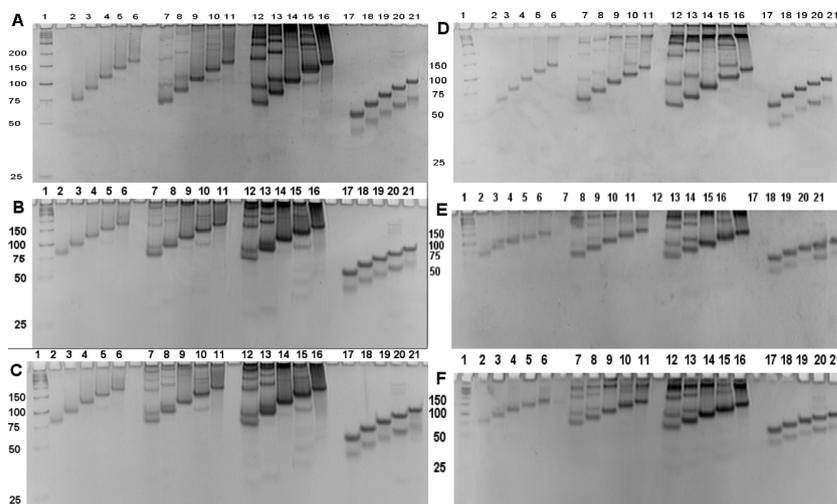


Рис. 7. Нативный аналитический электрофорез в 14% ПААГ реакций гибридизации. (А) – буфер ТАЕ, мгновенное охлаждение; (В) – буфер ТАЕ, градиентное охлаждение со скоростью 5°C/мин; (С) – буфер ТАЕ, градиентное охлаждение со скоростью 0.5°C/мин; (D) – буфер ТА-Mg, мгновенное охлаждение; (E) – буфер ТА-Mg, градиентное охлаждение со скоростью 5°C/мин; (F) – буфер ТА-Mg, градиентное охлаждение со скоростью 0.5°C/мин. Дорожка 1 – Маркер молекулярной массы, дорожки 2–6: $(A1)_2-(B1)_2$, $(A2)_2-(B2)_2$, $(A3)_2-(B3)_2$, $(A4)_2-(B4)_2$, $(A5)_2-(B5)_2$ в концентрациях 0.05 мкМ, дорожки 7–11: те же составы в концентрациях 0.5 мкМ, дорожки 12–16: те же составы в концентрациях 5 мкМ, дорожки 17–21: $(B1)_2-(C3-A1)$, $(B2)_2-(C3-A2)$, $(B3)_2-(C3-A3)$, $(B4)_2-(C3-A4)$, $(B5)_2-(C3-A5)$ при концентрации 0.5 мкМ.

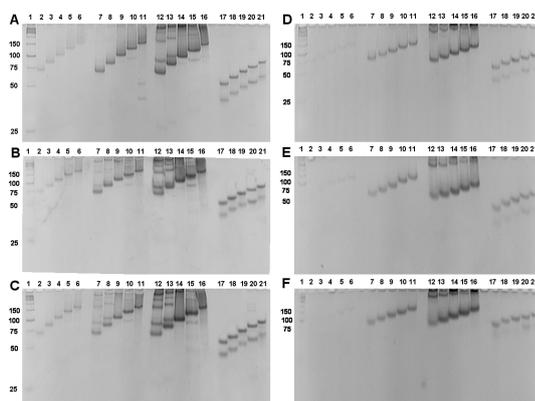


Рис. 8. Аналитический нативный электрофорез в 14% ПААГ из реакций гибридизации. (А) – 1× буфер ТА ЭН, мгновенное охлаждение; (Б) – 1× буфер ТА ЭН, градиентное охлаждение при 5°C/мин; (В) – 1× буфер ТА EN, градиентное охлаждение со скоростью 0.5°C/мин; (D) – буфер MES EN, мгновенное охлаждение; (Е) – буфер MES EN, градиентное охлаждение при 5°C/мин; (F) – буфер MES EN, градиентное охлаждение со скоростью 0.5°C/мин. Дорожка 1 – Маркер молекулярной массы, дорожки 2–6: (A1)₂–(B1)₂, (A2)₂–(B2)₂, (A3)₂–(B3)₂, (A4)₂–(B4)₂, (A5)₂–(B5)₂ в концентрациях 0.05 мкМ, дорожки 7–11: те же составы в концентрациях 0.5 мкМ, дорожки 12–16: те же составы в концентрациях 5 мкМ, дорожки 17–21: (B1)₂–(Cy3-A1), (B2)₂–(Cy3-A2), (B3)₂–(Cy3-A3), (B4)₂–(Cy3-A4), (B5)₂–(Cy3-A5) при концентрации 0.5 мкМ.

Для концентрации 0.5 мкМ исходных V-образных блоков, наблюдалось незначительное снижение числа дискретных структур более высокого порядка после мгновенного охлаждения в буферах ТАЕ, ТА-Mg и ТА-EN. Существенных различий в гибридизации блоков, имеющих негибридирующиеся линкерные цепи T_n не выявлено. Продукты «нанозтиленового» типа довольно эффективно образуются с использованием как олигонуклеотидов A1, B1, так и с их производными, содержащими линкеры T_n (n = 2–8).

Мы также сравнили два диазида на основе тетраэтиленгликоля и пентаэритрита в качестве разветвляющих реагентов. Диазид на основе тетраэтиленгликоля синтезировали по описанной методике. Гибридизация V-образных конъюгатов на основе диазида N₃CH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂N₃ в оптимизированных условиях дали димеры (A1)₂–(B1)₂ и (A5)₂–(B5)₂ типа «нанозтилен», подобные производным диазида **6** (Рис. 9).

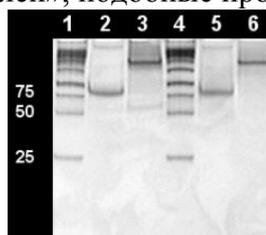


Рис. 9. Гибридизация V-блоков из диазидов **6** и N₃CH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂N₃. Аналитический нативный электрофорез в 14% ПААГ, реакции гибридизации в 1× буфере MES-EN, мгновенное охлаждение, концентрация 0.5 мкМ. Дорожки 1,4 – маркеры молекулярной массы; конъюгаты диазида **6**, дорожки 2, 3 – (A1)₂–(B1)₂, (A5)₂–(B5)₂; конъюгаты диазида N₃CH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂N₃, дорожки 5, 6 – (A1)₂–(B1)₂, (A5)₂–(B5)₂.

Однако в дальнейших исследованиях мы использовали диазид **6** на основе пентаэритрита с перспективой дальнейшей разработки блоков, полученных из аналогичных триазида **7** и тетраазида **8** на основе пентаэритрита. Таким образом, разработанная система не зависит от длины и гибкости линкеров T_n в V-блоках.

Состав буфера сильно влияет на формирование дискретных наноструктур из V-блоков. Магнийсодержащий буфер ТА-Mg, в отличие от своего контрольного антипода ТАЕ (с EDTA), привел к превосходной стабилизации образующихся структур при нативном электрофорезе в ПААГ. Набор наноструктур в реакционных смесях практически не отличался при использовании трис-ацетатных буферов с магнием и EDTA. Кислый буфер, содержащий

морфолинэтансульфо кислоту и этилендиамин (MES-EN), показал значительное отличие в гомогенности для всех вариантов гибридизаций. Добавление этилендиамина в качестве имитации Mg^{2+} в буфере MES сильно повлияло на образование основных димерных продуктов при исходных концентрациях 0.5 и 5 мкМ (Рис. 10).

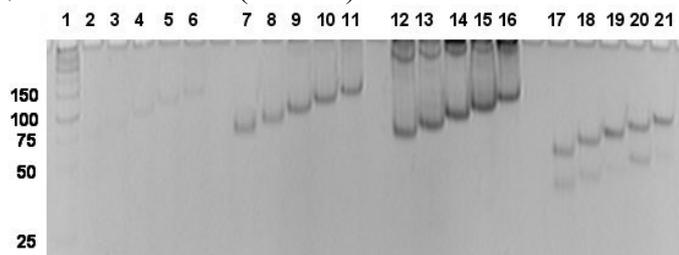


Рис. 10. Аналитический нативный электрофорез в 14% ПААГ реакций гибридизации. Буфер MES-EN, мгновенное охлаждение; дорожка 1 – маркер молекулярной массы, полосы 2–6: $(A1)_2-(B1)_2$, $(A2)_2-(B2)_2$, $(A3)_2-(B3)_2$, $(A4)_2-(B4)_2$, и $(A5)_2-(B5)_2$ в концентрации 0.05 мкМ, дорожки 7-11: то же композиции в концентрациях 0.5 мкМ, дорожки 12-16: то же композиции в концентрации 5 мкМ, дорожки 17–21: $(B1)_2-(Cy3-A1)$, $(B2)_2-(Cy3-A2)$, $(B3)_2-(Cy3-A3)$, $(B4)_2-(Cy3-A4)$ и $(B5)_2-(Cy3-A5)$ в концентрации 0.5 мкМ.

Однако использование буфера MES-EN при низкой концентрации (0.05 мкМ) начальных V-образных блоков приводило к неудовлетворительному формированию каких-либо наноструктур ДНК. Наиболее значимым параметром, влияющим на гибридизацию, оказалась начальная концентрация V-образных олигонуклеотидных конъюгатов. Более низкие концентрации в основном приводили к образованию единственного продукта – димера типа «наноэтилен». Однако увеличение концентрации до 0.5 или 5 мкМ приводит к формированию более сложных дискретных структур с более медленными миграционными подвижностями на электрофорезе. Структуры более высокого порядка не были целью данной работы, поэтому они не выделялись и не изучались. Предположительно, происходит формирование дискретных циклических конструкций типа «наноциклобутан», «наноциклогексан» и т. д. (Рис. 11).

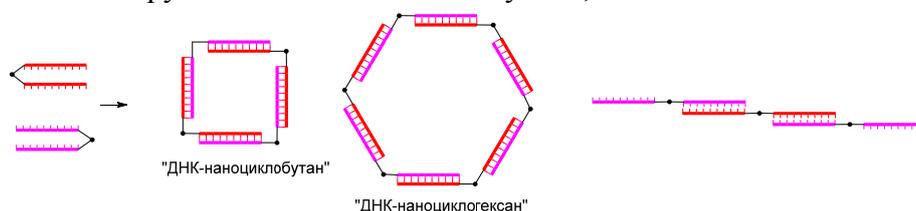


Рис. 11. Возможные дискретные ДНК-наноструктуры при олигомеризации двух блоков с двумя элементарными олигонуклеотидами.

Продукты гибридизации конъюгатов $(A5)_2$ и $(B5)_2$ в различных буферах исследовали с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ) (Рис. 12). АСМ выполнялась на поверхности атомарно ровного графита, модифицированного производным олигоглицина.

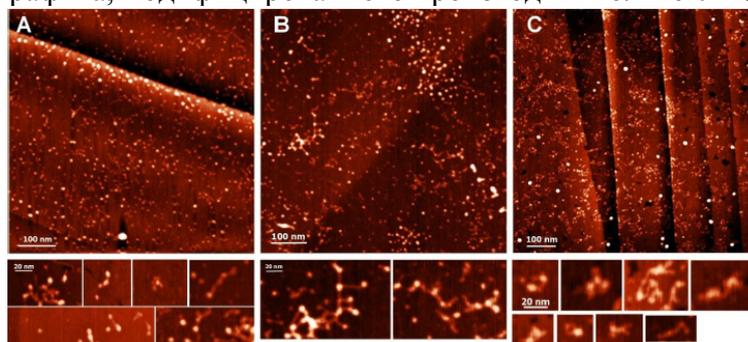


Рис. 12. Атомно-силовая микроскопия самоорганизующихся наноструктур, полученных гибридизацией эквимольных количеств $(A5)_2$ и $(B5)_2$ в различных буферах. Подложка – атомарно ровная поверхность модифицированного графита. Исходная концентрация V-образных блоков – 0.5 мкМ, мгновенное охлаждение: (А) – 1× буфер ТАЕ; (Б) – 1× буфер ТА Mg; (В) – 1× ТА Mg, 50 мМ Mg^{2+} .

Характерные изображения, наблюдаемые в трис-ацетатном буфере с разными концентрациями ионов Mg^{2+} , состояли из мелких глобулярных структур и более сложных и разветвленных сетчатых агломератов. Увеличение концентрации Mg^{2+} приводит к образованию разветвленных высокомолекулярных неупорядоченных структур. В первом случае (Рис. 12А) отсутствие ионов магния в буфере способствует предпочтительному формированию дискретных гантелеобразных структур, во втором случае (Рис. 12В) добавление в буфер 1 мМ ионов Mg^{2+} приводит к образованию более разветвленных структур. В третьем случае (Рис. 12С), 50 мМ концентрация ионов магния увеличивает количество высокомолекулярных неупорядоченных структур. В целом, однозначная визуализация таких небольших димеров с помощью АСМ – трудная задача, так как на поверхности модифицированного графита возможно сильное искажение наблюдаемых структур.

Наномономеры для сборки динамических ДНК-наноструктур

По аналогии со сборкой дискретных структур более высокого порядка при высоких концентрациях разветвленных конъюгатов мы предложили перегибридизацию по механизму замещения последовательности в качестве альтернативного контролируемого способа синтеза более сложных структур (Рис. 13).

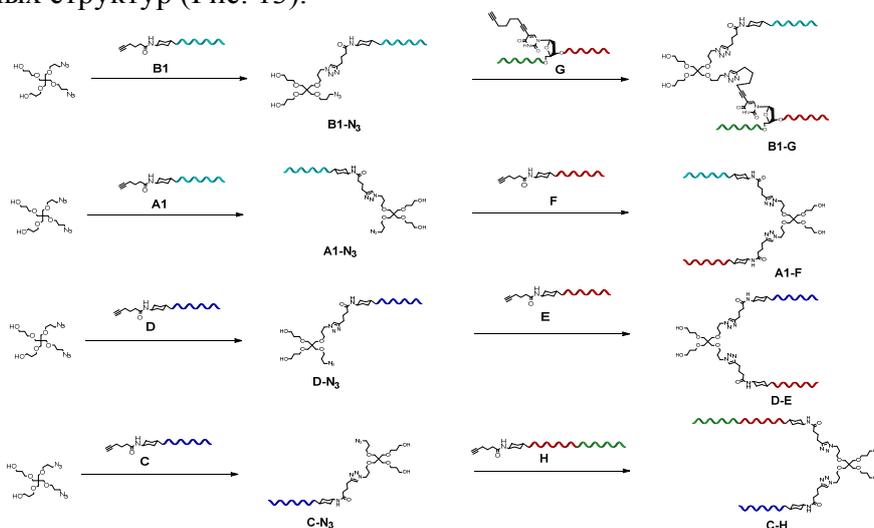


Рис. 13. Ступенчатый синтез гетерогенных V-блоков.

Для синтеза несимметричных гетерогенных V-образных конъюгатов мы выполнили поэтапное присоединение двух разных олигонуклеотидов к реагенту разветвления **6**, используя клик-реакцию CuAAC с образованием несимметричных димеров B1-G, A1-F, D-E, C-H (Рис. 13).

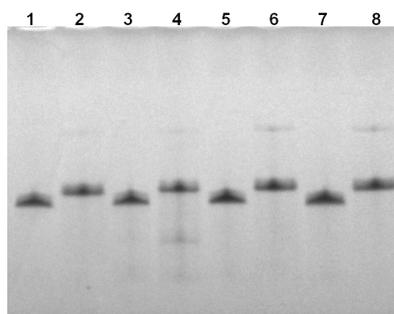


Рис. 14. Реакция алкин-модифицированных олигонуклеотидов с избытком диазида **6**. Аналитический денатурирующий 14%-ный ПААГ реакционных смесей, дорожки 1, 3, 5, 7 – исходные алкин-модифицированные олигонуклеотиды (B1, A1, D, C); дорожки 2, 4, 6, 8 – реакционные смеси, содержащие моноаддукты диазида **6** с олигонуклеотидами B1, A1, D, C.

После выделения полученных моноаддуктов олигонуклеотидов B1, A1, D, C с диазидом **6** (Рис. 14), была проведена следующая клик-реакция для введения в состав монопроизводных вторых последовательностей олигонуклеотидов (Рис. 15).

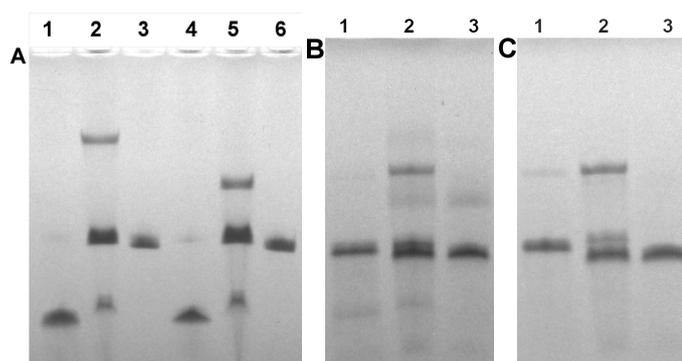


Рис. 15. Аналитический денатурирующий электрофорез в 14% ПААГ реакционных смесей. (А) дорожки: 1 – моноаддукт U11 и диазида **6**, 2 – моноаддукт В1 и диазида **6**, прореагировавший с олигонуклеотидом G, 3 – олигонуклеотид G, 4 – моноаддукт олигонуклеотида С и диазида **6**, 5 – реакция моноаддукта С и диазид **6** с олигонуклеотидом Н, 6 – олигонуклеотидом Н; (Б) дорожки: 1 – продукт клик-реакции между олигонуклеотидом А1 и диазидом **6**, 2 – моноаддукт А1 и диазида **6**, прореагировавший с олигонуклеотидом F, 3 – олигонуклеотид F; (В) дорожки: 1 – продукт клик-реакции между олигонуклеотидом D и диазидом **6**, 2 – моноаддукт D и диазида **6**, прореагировавший с олигонуклеотидом E, 3 – олигонуклеотид E.

Выделение и очистка гетерогенных разветвленных конъюгатов с диазидом **6** проводилась с помощью денатурирующего электрофореза в ПААГ. Анализ и подтверждение полученных структур проводили с помощью ВЭЖХ-МС. На Рис. 16 показана картина аналитического денатурирующего электрофореза очищенных гетерогенных конъюгатов с диазидом **6**.

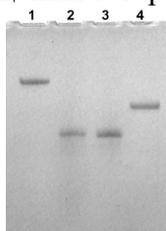


Рис. 16. Денатурирующий 14% ПААГ очищенных гетерогенных несимметричных V-образных блоков **B1-G**, **A1-F**, **D-E**, **C-H** (дорожки 1–4 соответственно).

Гибридизация V-образных блоков **B1-G** и **A1-F**, **D-E** и **C-H** в отработанных ранее условиях приводила к образованию двух димерных дискретных наноструктуры – **NM1** и **NM2**, соответственно (Рис. 17).

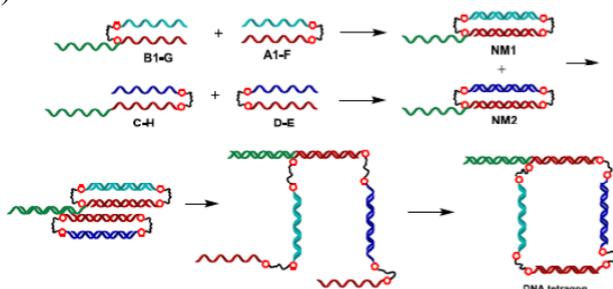


Рис. 17. Синтез «нанономеров» **NM1** и **NM2** и их спонтанная гибридационная перегруппировка, опосредованная адаптером, с образованием ДНК – «нанометилциклобутана».

В Таблице 1 приведены масс-спектрометрические данные всех очищенных гетерогенных V-образных конъюгатов. Полученные массы соответствуют расчетным.

Таблица 1. Состав и данные МС синтезированных несимметричных олигонуклеотид-олигонуклеотидных конъюгатов

Состав	Расч. $[M+nX]^+$	Получено $[M+nX]^+$
(B1-G)	20713.5 $[M+H]^+$	20712.5 $[M+H]^+$
(A1-F)	14250.2 $[M+NH_4]^+$	14250.4 $[M+NH_4]^+$
(D-E)	14153.1 $[M+Na]^+$	14153.6 $[M+Na]^+$
(C-H)	20817.5 $[M+H]^+$	20816.9 $[M+H]^+$

Оптимальные условия для сборки двух наномономеров **NM1** и **NM2** были такими: мгновенное охлаждение в буфере MES EN, 0.5 мкМ начальная концентрация V-образных блоков (Рис. 18 и Рис. 19).

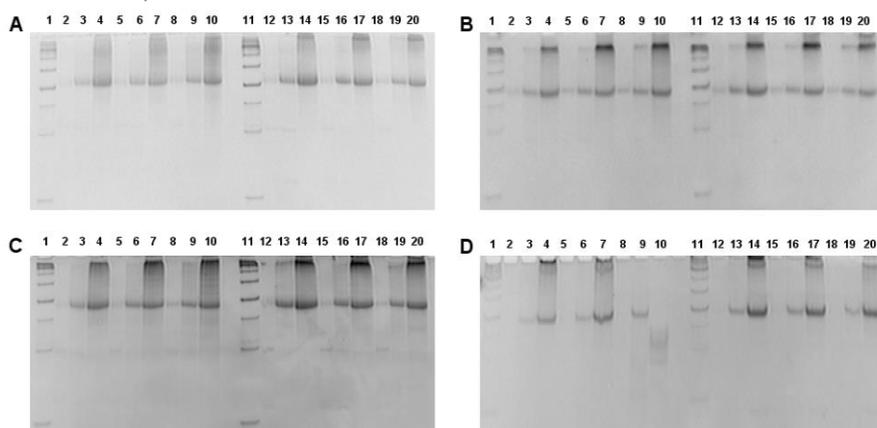


Рис. 18. Аналитический ПААГ реакций гибридизации с образованием димеров **NM1** и **NM2** в буферах: (A) – 1× TAE, (B) – 1× TA Mg, (B) – 1× TA EN, (D) – 1× MES EN. Дорожки: 1 – Маркер молекулярной массы; 2 – **NM1**, мгновенное охлаждение, 0.05 мкМ; 3 – **NM1**, мгновенное охлаждение, 0.5 мкМ; 4 – **NM1**, мгновенное охлаждение, 5 мкМ; 5 – **NM1**, градиентное охлаждение при 5°C/мин, 0.05 мкМ; 6 – **NM1**, градиентное охлаждение при 5°C/мин, 0.5 мкМ; 7 – **NM1**, градиентное охлаждение при температуре не менее 5°C/мин, 5 мкМ; 8 – **NM1**, градиентное охлаждение 0.5°C/мин, 0.05 мкМ; 9 – **NM1**, градиентное охлаждение при 0.5°C/мин, 0.5 мкМ; 10 – **NM1**, градиентное охлаждение 0.5°C/мин, 5 мкМ; 11 – Маркер молекулярной массы; 12 – **NM2**, мгновенное охлаждение – 0.05 мкМ; 13 – **NM2**, мгновенное охлаждение, 0.5 мкМ; 14 – **NM2**, мгновенное охлаждение, 5 мкМ; 15 – **NM2**, градиентное охлаждение при 5°C/мин, 0.05 мкМ; 16 – **NM2**, градиентное охлаждение при 5°C/мин, 0.5 мкМ; 17 – **NM2**, градиентное охлаждение при 5°C/мин, 5 мкМ; 18 – **NM2**, градиентное охлаждение 0.5°C/мин, 0.05 мкМ; 19 – **NM2**, градиентное охлаждение при 0.5°C/мин, 0.5 мкМ; 20 – **NM2**, градиентное охлаждение 0.5°C/мин, 5 мкМ.

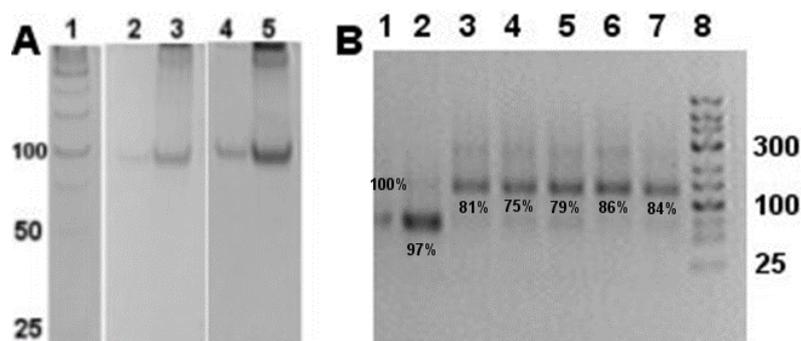


Рис. 19. (A) Сборка наномономеров **NM1** и **NM2**; Аналитический электрофорез в ПААГ, 1× MES EN. Дорожки: 1 – Маркер молекулярной массы; 2 – **NM1**, мгновенное охлаждение, 0.5 мкМ; 3 – **NM1**, мгновенное охлаждение, 5 мкМ; 4 – **NM2**, мгновенное охлаждение, 0.5 мкМ; 5 – **NM2**, мгновенное охлаждение, 5 мкМ; (B) индуцированная смещением цепи перегруппировка в циклическую тетрамерную структуру, электрофорез в 3% агарозном геле. Наномомеры собраны в буфере MES EN (дорожка 1 – **NM1**; 2 – **NM2**); смесь предварительно собранных наномономеров **NM1** и **NM2** (дорожка 3 – MES-EN; 4 – TAE; 5 – TA-EN; 6 – TA-Mg; 7 – TA-Ni), дорожка 8 – маркер молекулярной массы; Плотность полос на гелях анализировали с помощью ImageJ.

Молекулярное моделирование тетрамерного продукта из наномономеров **NM1** и **NM2** показало, что длина линкера предотвращает деформации валентных и двугранных углов как в структуре линкера, так и сахарофосфатном остове в двухцепочечных фрагментах ДНК (Рис. 20).

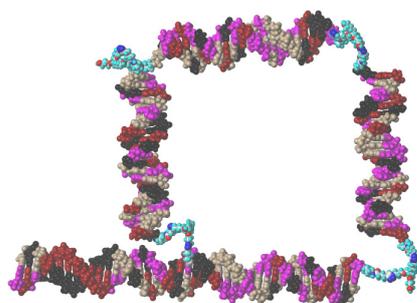


Рис. 20. Молекулярная модель основного продукта, полученного в наномасштабной реакции «нано-мономеров» **NM1** и **NM2**. Нуклеотиды: Т – черный, С – пурпурный, G – серый, А – красный; атомы в линкерах: водород – сине-зеленый, углерод – белый, азот – синий, кислород – красный.

Для исследования влияния порядка смешивания компонентов мы опробовали три способа смешивания. В первом эксперименте четыре гетерогенных V-образных блока (**B1-G**, **A1-F**, **D-E**, **C-H**) смешивали одновременно в различных буферах либо при комнатной температуре (Рис. 21, дорожки 2–6), либо при нагреве и последующем охлаждении (Рис. 21, дорожки 7–11), для образования циклического тетрамера и циклических олигомеров более высоких порядков.

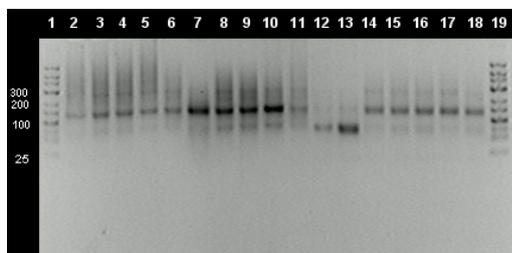


Рис. 21. Аналитический 3%-ный электрофорез в агарозном геле реакции сополимеризации ДНК. Дорожки 1, 19 – маркер молекулярной массы; смесь **B1-G**, **A1-F**, **D-E**, **C-H** при комнатной температуре без нагрева (дорожка 2 – MES-EN; 3 – TAE; 4 – TA-EN; 5 – TA-Mg; 6 – TA-Ni); смесь **B1-G**, **A1-F**, **D-E**, **C-H** после нагревания до 95°C (дорожка 7 – MES-EN; 8 – TAE; 9 – TA-EN; 10 – TA-Mg; 11 – TA-Ni); наномономеры, собранные в буфере MES-EN (дорожка 12 – **NM1**; 13 – **NM2**); смесь предварительно собранных наномономеров **NM1** и **NM2** (дорожка 14 – MES-EN; 15 – TAE; 16 – TA-EN; 17 – TA-Mg; 18 – TA-Ni).

Вторая процедура заключалась в смешивании двух предварительно организованных наномономеров **NM1** и **NM2** (Рис. 21, дорожки 12–13) в буфере MES. **NM1** и **NM2** были получены из двух пар гетерогенных V-образных блоков: (**B1-G**)+(A1-F), (**D-E**)+(C-H). Гибридизация двух наномономеров, обладающих липкими концами в различных буферах при комнатной температуре привела к высокому выходу тетрамерного циклического продукта с незначительными количествами тяжелых побочных продуктов (Рис. 21, дорожки 14–18).

Третья процедура основана на сборке наномономеров **NM1** (Рис. 22, дорожки 2–6) и **NM2** (Рис. 22, дорожки 7–11) в разных пробирках. Затем наномономеры были объединены, образуя тетрамер вместе с примесями более высокого порядка (Рис. 22, дорожки 12–16).

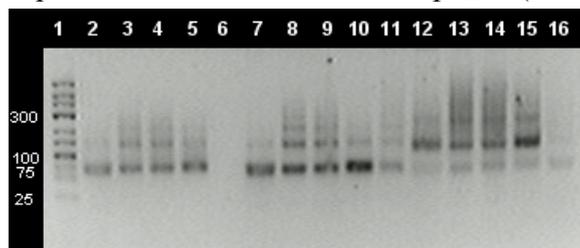


Рис. 22. Аналитический 3%-ный электрофорез в агарозном геле реакции сополимеризации ДНК. Дорожка 1 – маркер молекулярной массы; предварительно собранный наномономер **NM1** (дорожка 2 – MES-EN; 3 – TAE; 4 – TA-EN; 5 – TA-Mg; 6 – TA-Ni) и **NM2** (дорожка 7 – MES-EN; 8 – TAE; 9 – TA-EN; 10 – TA-Mg; 11 – TA-Ni); смесь наномономеров **NM1** и **NM2** (12 – MES-EN; 13 – TAE; 14 – TA-EN; 15 – TA-Mg; 16 – TA-Ni).

Наномономеры **NM1** и **NM2**, а также их продукт гибридизации ДНК-тетрамер, были изучены с помощью АСМ (Рис. 23). Морфологию наномономеров **NM1** и **NM2** исследовали в буфере MES-EN, который подходит для АСМ-анализа небольших димерных наноструктур типа «наноэтилен». Трис-ацетатный буфер (с ионами Mg^{2+} или без них) оказал влияние на форму димерных структур. Наблюдаемые структуры (**NM1** и **NM2**) состоят из доменов, похожих на гантели. Типичные домены (Рис. 23А,В) были 7–8 нм в длину и 0.5–1 нм в высоту, что соответствует размеру исходных олигонуклеотидов E, C, F, D, B1 и A1. Более детальное исследование формы также показало наличие одноцепочечных фрагментов в наномономерах. Изображение полученной смеси (**NM1** + **NM2**, Рис. 23С) показало ожидаемые сложные сетчатые разветвленные структуры представляющий собой продукт перегруппировки двух наномономеров в тетрамерный продукт и высшие олигомеры.

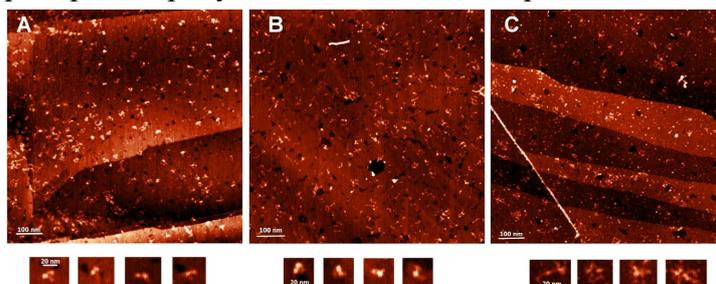


Рис. 23. Атомно-силовая микроскопия продуктов гибридизации; (А) синтез **NM1** из **B1-G** и **A1-F**; (В) синтез **NM2** из **D-E** и **C-H** (0.5 мкМ, мгновенное охлаждение, 1× MES-EN); (С) гибридизация **NM1** и **NM2** (оба 0.25 мкМ). Подложка: модифицированный графит.

Чтобы доказать решающую роль одноцепочечного фрагмента в наномономерах при сборке компактного и дискретного ДНК-тетрагона из двух димеров типа наноэтилена, мы провели эксперимент с использованием усеченных версий строительных блоков **NM1** и **NM2**. Несколько возможных путей сборки тетрамера показаны на Рис. 24.

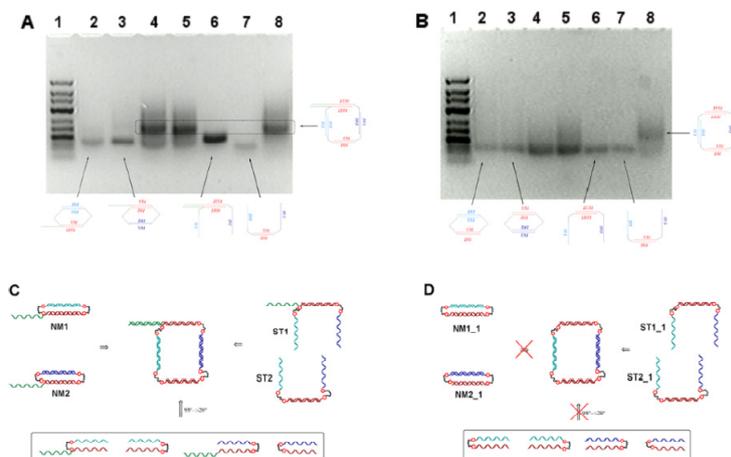


Рис. 24. (А) Электрофорез в 3% агарозном геле. (А) Дорожка 1 – маркер молекулярной массы; наномономеры, собранные в буфере MES-EN (дорожка 2 – **NM1**; 3 – **NM2**); смесь предварительно собранных наномономеров **NM1** и **NM2** в MES EN (дорожка 4); смесь V-образных блоков B1-G, A1-F, D-E, и C-H после нагревания и охлаждения (дорожка 5); предварительно собранный полуквадрат **ST1** (дорожка 6); предварительно собранный полуквадрат **ST2** (дорожка 7), смесь предварительно собранных полуквадратов **ST1** и **ST2** (дорожка 8). (В) дорожка 1 – маркер молекулярной массы; наномономеры, собранные в буфере MES-EN (дорожка 2 – **NM1_1**; 3 – **NM2_2**); смесь предварительно собранных наномономеров **NM1_1** и **NM2_1** в MES EN (дорожка 4); смесь V-образных блоков A1-F, B1-E, C-F и D-E после нагревания и охлаждения (дорожка 5); предварительно собранный полуквадрат **ST1_1** (дорожка 6); полуквадрат **ST1_2** в собранном виде (дорожка 7), смесь предварительно собранных полуквадратов **ST1_1** и **ST2_1** (дорожка 8). (В) Доказательство сборки ДНК-«нанометилциклобутана» по механизму замещения последовательности. (С) Сборка тетрагональных наноструктур без валентного одноцепочечного олигонуклеотидного фрагмента.

Гибридикация блоков, модифицированных одноцепочечным олигонуклеотидом (Рис. 24А, дорожка 4 и Рис. 25) дала эффективную сборку тетрамера из наномономеров, тогда как использование простых наноэтиленов не привело к образованию димеров (Рис. 24В, дорожка 4 и Рис. 26).

Единственный способ получить простой четырехугольник (Рис. 25) – это ступенчатая гибридикация V-образных блоков в два «полуквадрата», которые подвергаются дальнейшей гибридикации (Рис. 24В, дорожка 8). Ни гибридикация двух наноэтиленов NM1_1 и NM2_1, ни прямая гибридикация четырех гетерогенных V-образных блоков не дали желаемый тетрамер (Рис. 24В, дорожки 4 и 5).

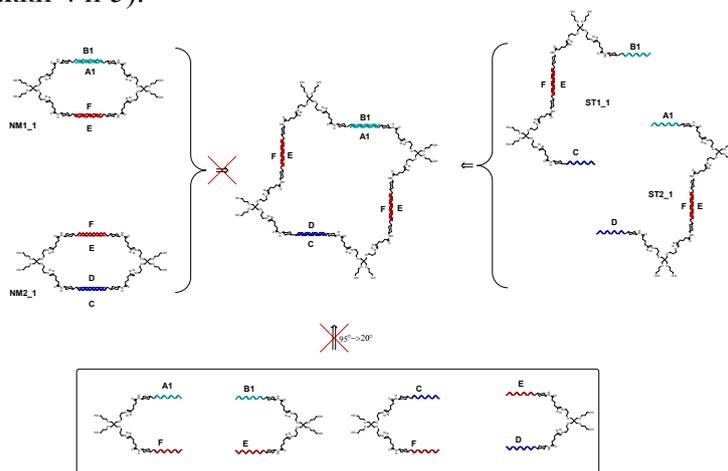


Рис. 25. Сборка тетрагональных ДНК-наноструктур без валентного промотора одноцепочечной ДНК.

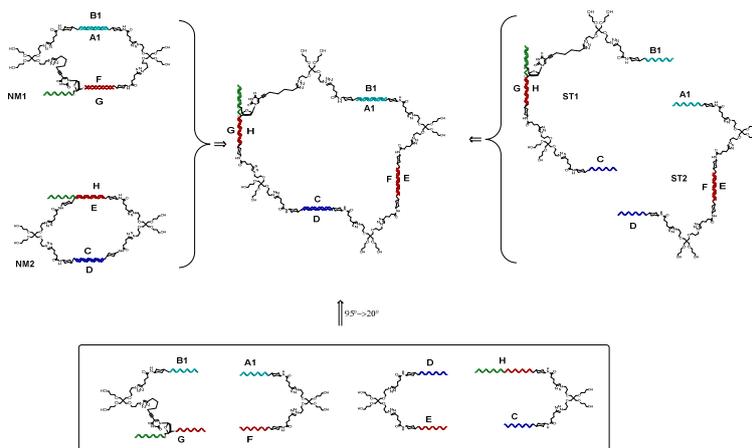


Рис. 26. Доказательство сборки тетрамера по механизму замещения последовательности.

Таким образом, одноцепочечный фрагмент важен для правильной гибридикации наномономеров или одновременной гибридикации четырех V-образных конъюгатов ДНК (Рис. 26).

Олигонуклеотидные конъюгаты, содержащие разветвлённые кластеры N-ацетилгалактозамина

В случае получения азидных производных олигонуклеотидов необходимо соблюдать определенные меры предосторожности во время синтеза, поскольку азидные фосфорамидиты вступают в реакцию Штаудингера в ацетонитриле, что приводит к их деградации. Можно избежать их деградации, иммобилизовав азидные производные на твердофазных носителях, или используя раствор азидного фосфорамидита в дихлорметане. Кроме того, конъюгация в растворе трудно применима к гидрофобным молекулам из-за их плохой растворимости в воде или в водноорганических смесях. Среди методов твердофазной функционализации, только сочетание по реакции Соногаширы было адаптировано для автоматического синтезатора ДНК. Большинство из упомянутых подходов были основаны на методах вне синтезатора

(включая несовместимое с синтезатором микроволновое облучение или нагревание) или требовали длительного времени реакции (до 24 ч). Более того, в большинстве случаев конечный продукт представляет собой смесь региоизомеров, что усложняет рутинную очистку высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) из-за уширения или удвоения пиков. В настоящее время многие рутинные процедуры заменяются автоматизированными. Автоматизированные платформы могут использоваться не только для синтеза биополимеров, но также для малых молекул и определенных полимеров с помощью различных химических веществ. Целью работы по получению олигонуклеотидов, содержащих кластеры N-ацетилгалактозамина, была разработка подходов к медь-катализируемому азид-алкиновому циклоприсоединению на твердой фазе в синтезаторе, которая обеспечивает получение одного региоизомера и может дополнить фосфорамидитный метод своей простотой, широтой применимости и низкой стоимостью мечения и конъюгации.

При проведении скрининга, конъюгация в растворе оказывается трудоемкой процедурой, поэтому предпочтительны твердофазные подходы. Кроме того, высокая стабильность растворов азидов при комнатной температуре по сравнению с фосфорамидитами должна снизить стоимость редко используемых модификаторов из-за длительного времени нахождения на синтезаторе. Единственный недостаток твердофазной конъюгации – требование стабильности конъюгата во время постсинтетического удаления защиты аммонолизом или аминолизом (в присутствии метиламина). Оптимальное время реакции для должно быть менее 3 ч. В этом случае синтез олигонуклеотидов может проходить в течение ночи, включая стадию мечения и снятие защитных групп на синтезаторе во время постсинтетических процедур. Кроме того, растворы должны быть стабильными, а концентрация производных азидов не должна превышать 0.05 M, что сделает метод экономически конкурентоспособным с твердофазным фосфорамидитным синтезом.

Первоначально протестированные водный *t*-BuOH и водный DMSO в качестве сред для твердофазной клик-реакции показали высокую вязкость и высокое поверхностное натяжение, что привело к образованию капель и неправильной подаче реагента в синтезаторе ДНК. Поэтому мы изучили твердофазную клик-реакцию в нескольких апротонных полярных растворителях: формамиде, MeCN, диметилсульфоксиде, диметилформамиде и диметиламинине (DMAA). Поскольку большинство компонентов реакции, включая азиды красителей, плохо растворялись в формамиде и MeCN, эти растворители были исключены из исследования. Затем мы провели скрининг ряда медных катализаторов (включая CuCl, Cu(MeCN)₄PF₆, CuI/N,N-диизопропилэтиламин (DIPEA), CuCl·трис[(1-бензил-1*H*-1,2,3-триазол-4-ил)метил]амин (ТВТА), CuBr·Me₂S, CuBr·PhSMe, CuBr·ТВТА и CuI·P(OEt)₃, для поиска оптимального варианта. В случае CuCl, Cu(MeCN)₄PF₆, CuI/DIPEA и CuCl·ТВТА выходы продукта были менее 5–30%, тогда как для CuBr·PhSMe, CuBr·ТВТА и CuI·P(OEt)₃ конверсия превысила 95%. Для оптимизации твердофазной клик-реакции мы начали с относительно высоких концентраций катализаторов (100 мМ) и постепенно их снижали. Комплекс тиоанизола был исключен, поскольку выходы значительно снижались при низких концентрациях реагентов; наблюдалось образование некоторых побочных продуктов, а длительный неприятный запах делал работу неудобной. Найдено, что DMSO – плохой растворитель как для CuBr·ТВТА, так и для CuI·P(OEt)₃, поскольку образовывались осадки в растворах в течение ночи, вероятно, в результате окисления катализатора. Эти два катализатора дали подобные выходы, а CuBr·ТВТА оказался немного лучше с точки зрения конверсии. Наилучший результат показала каталитическая смесь CuI·P(OEt)₃/DMAA, поскольку она всегда давала качественные конъюгаты без особых мер предосторожности.

Направленная доставка служит ключевым моментом для олигонуклеотидной терапии. Липидные наночастицы и конъюгаты N-ацетилгалактозамина (GalNAc) доказали свою эффективность для антисмысловой олигонуклеотид- и siRNA-направленной доставки в печень в различных клинических испытаниях. Главной особенностью значительно модифицированных конъюгатов siRNA-GalNAc является чрезвычайно длительное действие *in vivo* после подкожной инъекции (до 9 месяцев) при низкой ED₅₀ 0.5–2 мг/кг. Такой замечательный эф-

фект оказывается результатом их повышенной стабильности и эффективного рецептор-опосредованного эндоцитоза рецептором ASGPR в гепатоцитах. Конъюгаты, содержащие кластеры GalNAc с определенной геометрией, имеют значительно большее сродство к ASGPR из-за олигомеризации рецептора в клеточной мембране. Конечная цель нашего исследования состояла в разработке новых конъюгатов GalNAc-siRNA, получаемых по упрощенной процедуре. После проникновения в цитозоль, антисмысловая цепь siRNA захватывается белковым аппаратом РНК-интерференции, в то время как смысловая цепь отщепляется и деградирует. Таким образом, доставочный фрагмент должен быть присоединен к смысловой цепи для минимизации влияния на взаимодействия «белок-РНК». Олигонуклеотид ANSA выступает смысловой цепью широко используемой siRNA для нацеливания на белок теплового шока гомолога АТФазы 1 (АНА1 или АНСА1) у мышей. Этот белок равномерно экспрессируется в большинстве тканей и часто используется для изучения специфичности направленной доставки siRNA *in vivo*. Luc является смысловой цепью siRNA люциферазы, которая используется в качестве отрицательного контроля для исследований *in vitro* и *in vivo*, поскольку люцифераза отсутствует у мышей дикого типа.

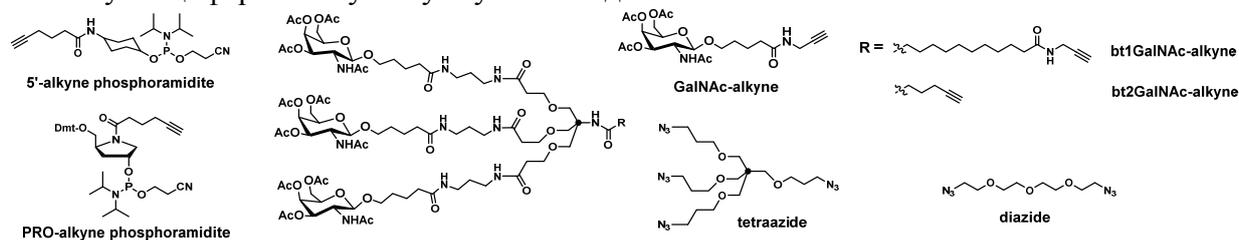


Рис. 27. Модификации, использованные для синтеза олигонуклеотидных конъюгатов с кластерами N-ацетилгалактозамина.

Процедура конъюгации основана на двух последовательных клик-реакциях CuAAC с моноалкиновым олигонуклеотидом: сначала с ди- или тетраазидом, затем с алкиновыми производными GalNAc (Рис. 28). Производные диазида и тетраазиды используются в большом избытке (10 или 20 экв. на алкин) для исключения межолigonуклеотидного сшивания, в то время как более дорогостоящие алкиновые производные GalNAc добавляются в минимальном избытке. Синтезирован ряд мульти-GalNAc-олигонуклеотидных конъюгатов с различной топологией (Рис. 28).

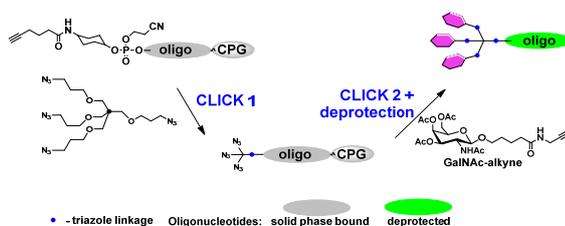


Рис. 28. Схема твердофазного синтеза конъюгатов олигонуклеотидов с GalNAc-кластерами.

Твердофазный подход CuAAC на основе тетраазиды (Рис.28) позволил нам синтезировать даже олигонуклеотидный конъюгат с шестью производными Tris-GalNAc, присоединенными как к 5'-, так и к 3'-концам (по три на каждом конце). Это позволяет ввести 18 остатков GalNAc на олигонуклеотид после одного добавления (Рис. 29).

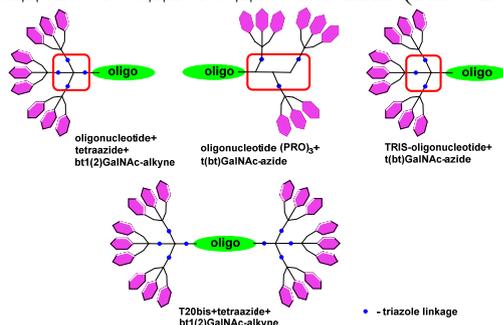


Рис. 29. Структуры конъюгатов с GalNAc-кластерами.

Синтез разветвлённых конъюгатов EGFR-специфического аптамера, содержащих ферментативно-отщепляемый MMAE

Конъюгаты антитело-препарат (ADC) – прекрасные примеры адресной доставки препарата («полезной нагрузки») к опухолям; их эффективность, фармакодинамика и фармакокинетика достаточно хорошо изучены. Концепция адресной доставки лекарств основана на высокоспецифичном для опухоли взаимодействии между целевой молекулой и опухолевым маркером, которое заключается в связывании с этим маркером (рецептором) с последующей интернализацией в клетку. Внутриклеточное высвобождение полезной нагрузки начинается убивать опухолевую клетку в соответствии с механизмом действия препарата. Последние два десятилетия были знаковыми в разработке адресной терапии рака, связанной с высокими финансовыми затратами, однако наборы используемых полезных нагрузок и расщепляемых линкеров довольно ограничены. Более того, сложность сайт-специфической модификации антител накладывает проблему однородности ADC и стехиометрического контроля соотношения лекарство-антитело. Существует несколько примеров ADC, разрабатываемых для терапии опухолей мозга, однако уникальная биология опухолей мозга требует специально разработанных стратегий разработки лекарств. Хотя предполагается, что ГЭБ проникаем во многих случаях глиобластомы, прохождение ADC через него все еще считается проблемой, которая требует изучения и разработки подходов для преодоления неэффективной доставки конъюгатов лекарственных средств в опухоль через ГЭБ. Аптамеры представляют собой олигонуклеотидные последовательности, способные распознавать специфическую цель со средством, сопоставимым со связыванием антитела с антигеном. Их терапевтический потенциал хорошо известен, включая противораковые применения. Было разработано несколько последовательностей аптамеров для нацеливания на EGFR. Вдохновленные активной разработкой селективных противораковых препаратов на основе антител, мы стремимся нацеливаться на EGFR с помощью аптамеров, загруженных противораковым препаратом MMAE. Потенциальные преимущества конъюгатов аптамер-лекарство заключаются в следующем: 1) высокое сродство к специфической цели; 2) возможности сайт-специфической модификации аптамеров (современный олигонуклеотидный синтез позволяет контролировать все модификации и однородность). Однако есть некоторые недостатки таких конъюгатов, связанные с низкой стабильностью в кровотоке, поскольку нуклеиновые кислоты не приспособлены для функционирования в таких условиях. Тем не менее, проблема стабильности в кровотоке была преодолена в бессмысленных олигонуклеотидах с использованием углеводных и фосфатных модификаций. В этой парадигме аптамер выступает средством доставки, но интернализация не очевидна, поэтому нам необходимы конъюгаты различной структуры для изучения их проникновения в клетки посредством опосредованной EGFR интернализации. Таким образом, задача состояла в разработке методологии конъюгации аптамера с полезным грузом через расщепляемый катепсином В линкер и синтеза более высокомолекулярных, разветвленных конъюгатов. Последние могут содержать один, два и три аптамерных фрагмента (Рис. 30). В целом, мультимеризация была признана полезным подходом к улучшению специфичности и сродства аптамеров. Пептидные линкеры, расщепляемые катепсином В, уже были объединены с олигонуклеотидами, однако с использованием довольно сложных подходов. В этой работе предложены подходы к синтезу разветвленных аптамерных конъюгатов с ферментативно-отщепляемой нагрузкой в виде монOMETИЛАУРИСТАТИНА Е (MMAE).

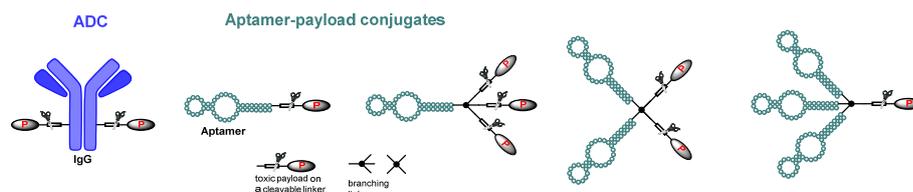


Рис. 30. Схематические структуры распространенных конъюгатов антитело–лекарственное средство (соотношение лекарственное средство/антитело может варьироваться от 1 до 8) и конъюгатов аптамер–лекарственное средство, полученных в этой работе.

В качестве модели EGFR-таргетинга был выбран ДНК-аптамер – GR20, а высокоцитотоксичный монотилауристатин (ММАЕ) представлял собой полезную нагрузку в конъюгатах аптамеров. MMAE и его конъюгаты не одобрены для лечения опухолей мозга. Для соединения части полезной нагрузки с аптамером в качестве линкера был выбран катепсин В, поскольку он одобрен в нескольких ADC и расщепляется под воздействием фермента в лизосомах. Ключевой реакцией конъюгации было Cu(I)-катализируемое азид-алкиновое циклоприсоединение (CuAAC) как быстрая, удобная реакция, биоортогональная по отношению к аптамерам, MMAE и линкеру Val-Cit-PABC.

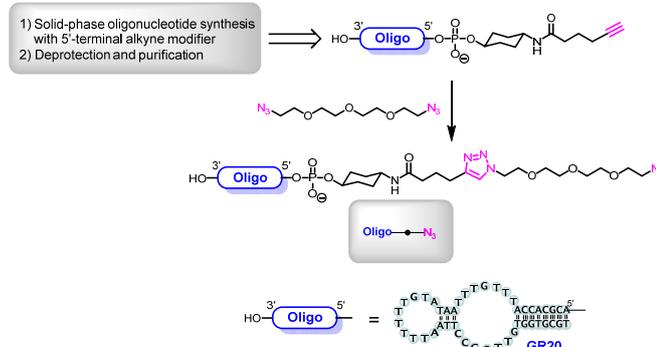


Схема 4. Синтез 5'-азидо-модифицированных олигонуклеотидов.

Синтетические аптамеры были получены с использованием стандартного протокола путем модификации 5'-алкином, после чего была проведена CuAAC с избытком диазида или тетразида в жидкой фазе, что дало азид-модифицированные олигонуклеотиды (Схема 4). Олигонуклеотид, модифицированный 5'-азидом, далее был связан с алкиновым производным полезной нагрузки, уже содержащим ферментативно расщепляемый линкер, Alkyne-Val-Cit-PABC-MMAE (Схема 5). CuAAC клик-реакция была проведена в водном растворе и дала высокие выходы конъюгатов олиго-полезная нагрузка со стехиометрией 1:1 (Схема 5).

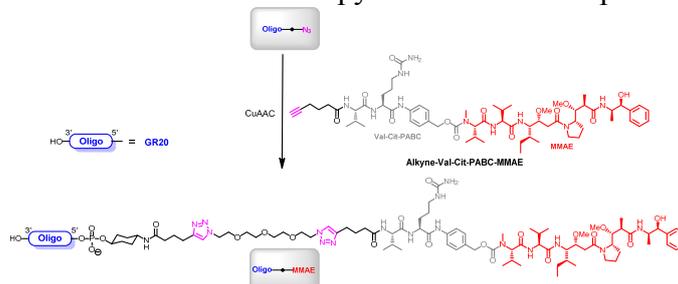


Схема 5. Синтез конъюгатов олигонуклеотид-5'-полезная нагрузка 1:1; красный – полезная нагрузка MMAE, серый – расщепляемый катепсином линкер.

Клик-реакция алкиновых олигонуклеотидов с тетразидом **8** приводит к образованию набора продуктов, состоящего из разветвленных конъюгатов – Oligo(N₃)₃, (Oligo)₂(N₃)₂, (Oligo)₃N₃. Стехиометрия полученных продуктов была настроена избытком азида по отношению к алкиновому олигонуклеотиду (Схема 6).

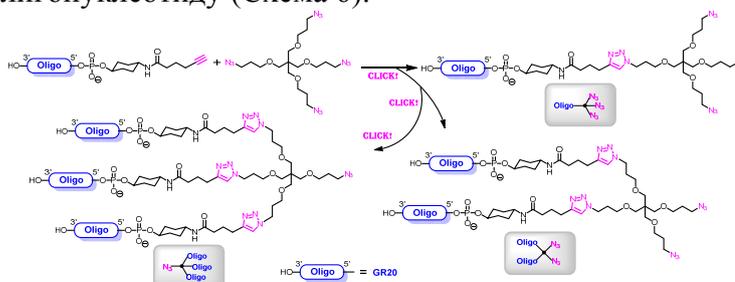


Схема 6. CuAAC-модификация 5'-алкин-олигонуклеотидов тетразидом **8**.

Полученные азидо-модифицированные олигонуклеотиды были трансформированы в конъюгаты с полезной нагрузкой через CuAAC с алкин-модифицированным Val-Cit-PABC-MMAE). Стехиометрия конъюгатов варьировалась в диапазоне 1:3, 2:2, 3:1 (Схема 7). Целе-

вые конъюгаты были очищены с помощью препаративной ВЭЖХ и проанализированы с помощью денатурирующего ПААГ и ВЭЖХ.

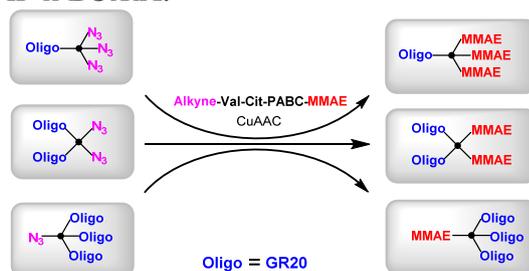


Схема 7. CuAAC-модификация 5'-алкин-олигонуклеотидов тетразидом. Структуры полезной нагрузки и расщепляемого линкера см. на схеме 5.

Была создана панель из четырех загруженных MMAE конъюгатов аптамера GR20 с четырьмя различными стехиометриями. Клик-реакция с модифицированным алкином MMAE была проведена *one-pot* с контролем с помощью ВЭЖХ и электрофореза в ПААГ промежуточных модифицированных азидом конъюгатов аптамера GR20 (Схемы 5, 6). Первоначальный алкин-GR20 (Рис. 31В) имел самую высокую электрофоретическую подвижность. Электрофоретический контроль клик-реакции между алкином-GR20 и избытком диазида или тетразида показал образование продуктов, OligoN_3 и $\text{Oligo}(\text{N}_3)_3$, соответственно (Рис. 31А).

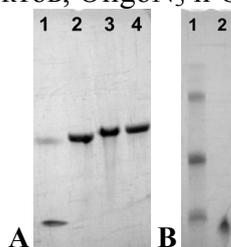


Рис. 31. 10% аналитический денатурирующий ПААГ. (А) 1 – красители ВВ+ХС, 2 – алкин-GR20, 3 – клик-реакция алкин-GR20 с диазидом тетраэтиленгликоля, 4 – клик-реакция алкин-GR20 с избытком тетразида. (В) 1 – щелчок алкина-GR20 с тетразидом в молярном соотношении 3:1, 2 – алкин-модифицированный GR20.

Непрореагировавшего алкина-GR20 не наблюдалось с помощью электрофореза. Пик В1 (Рис. 32) был определен как пик тетра-конъюгата, поэтому в последующей реакции с алкином-MMAE он не трансформировался в нагруженный конъюгат, и мы наблюдали его в неизменном виде как пик С1 (Рис. 32). Все азидосодержащие конъюгаты аптамера GR20 с соответствующими пиками В2, В3 и В4 трансформировались в нагруженные конъюгаты С2, С3 и С4 соответственно (Рис. 32).

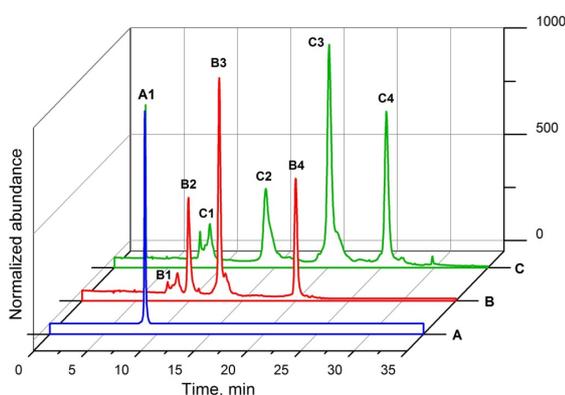


Рис. 32. Типичный профиль ВЭЖХ клик-реакции между алкином-GR20 и тетразидом. А – Профиль ВЭЖХ чистого исходного алкиномодифицированного аптамера GR20. В – Профиль ВЭЖХ клик-реакции между тетразидом и алкином-модифицированным GR20. С – Профиль ВЭЖХ клик-реакции между смесью азид-модифицированного GR20 и алкином-модифицированного MMAE.

Биологические свойства нескольких конъюгатов были изучены с помощью анализа МТТ на раковых клетках EGFR+: модели глиобластомы U251, U87 и рак толстой кишки HCT116. Для тестов на жизнеспособность клеток мы выбрали два конъюгата – GR20MMAE и GR20MMAE₃, чтобы сравнить влияние стехиометрии конъюгата. Конъюгаты содержали один и три фрагмента MMAE соответственно. Линия клеток HCT116 показала хороший ответ на оба конъюгата. Значения IC₅₀ GR20MMAE и GR20MMAE₃ для HCT116 имели приблизительно наномолярную величину. Линия клеток U87 была довольно стабильной в присутствии даже высоких концентраций конъюгатов GR20MMAE и GR20MMAE₃, поэтому анализ МТТ не показал значения концентрации, при которой может наблюдаться 50% жизнеспособность клеток. Однако другая модельная клеточная линия глиобластомы, U251, показала различия между конъюгатами GR20MMAE и GR20MMAE₃. Конъюгат с тремя фрагментами MMAE, GR20MMAE₃, показал более мощную активность по сравнению с GR20MMAE, который был практически неэффективен против клеточной линии U251.

Полезная нагрузка MMAE – это короткий, химически стабильный пептид с хорошо разработанными процедурами для его модификации различными функциональными ферментативно расщепляемыми линкерами. MMAE – это мощный ингибитор тубулина, успешно используемый в качестве полезной нагрузки в нескольких одобренных ADC на Val-Cit-PAVC-линкере. 46-мерная ДНК-последовательность – EGFR-таргетирующий аптамер GR20, использовалась в качестве модельного олигонуклеотида для построения конъюгатов. ДНК-аптамеры обычно структурированы, образуя одну или несколько шпилек в нормальных условиях. Конъюгаты содержат олигонуклеотид, точку разветвления и модули линкера/полезной нагрузки. Эти фрагменты соединяются вместе в двух последовательных клик-реакциях. Первый шаг – реакция тетразида **8** с модифицированным алкином аптамером. Она дает три продукта со стехиометрией аптамер/азид 1:3, 2:2 и 3:1. Соотношение продуктов реакции контролируется соотношением исходных соединений. Эти промежуточные азидные продукты, содержащие один, два или три олигонуклеотидных фрагмента, легко разделяются с помощью электрофореза в ПААГ или ВЭЖХ и, следовательно, легко доступны в виде чистых индивидуальных соединений. Последние легко преобразуются в соответствующие конъюгаты аптамер–полезная нагрузка.

Полезная нагрузка участвует на этапе модификации как производное линкера. Почти все распространенные ферментативно расщепляемые линкеры и токсичные полезные нагрузки выдерживают условия CuAAC, что делает подход универсальным и подходящим для всего имеющегося диапазона линкеров и полезных нагрузок, включая потенциально новые. Более того, модульный принцип может быть разработан в будущем для построения конъюгатов, несущих две разные полезные нагрузки или пептиды, улучшая транспорт через ГЭБ. Сочетание в одном конъюгате двух полезных нагрузок с разными мишенями рассматривается как перспективный подход к преодолению резистентности опухолей к терапии. Разработка пептидов/белков, нацеленных на рецептор трансферрина, считается актуальным способом доставки лекарств в мозг. Поэтому мы продолжим разработку химических подходов к конъюгатам, содержащим распознающие, усиливающие транспорт и терапевтические фрагменты.

Мы разработали общий подход к синтезу конъюгатов олигонуклеотид–MMAE различной стехиометрии с ферментативно расщепляемой полезной нагрузкой. Метод основан на двухшаговом клик-подходе. На первом этапе алкинмодифицированный олигонуклеотид легко трансформируется в азидные производные посредством клик-реакции с ди- или тетразидом в растворе. Полученные азидомодифицированные олигонуклеотиды/аптамеры затем реагируют с алкинмодифицированным производным MMAE, содержащим расщепляемый ферментом линкер. Разветвленные и линейные конъюгаты EGFR-таргетирующего аптамера GR20 были получены и протестированы на различных линиях раковых клеток. Общий модульный подход потенциально подходит для сборки конъюгатов любых олигонуклеотидных последовательностей, полезных нагрузок, расщепляемых линкеров и стехиометрии.

ВЫВОДЫ

1. На основе тетра-*O*-(3-гидроксипропил)пентаэритрита получены гидрофильные ди-, три- и тетраазидные реагенты, использованные для синтеза олигонуклеотидных конъюгатов с помощью биоортогонального медь(I)-катализируемого азид-алкинового циклоприсоединения. Метод позволяет с высоким выходом синтезировать олигонуклеотид-олигонуклеотидные конъюгаты, в том числе модифицированные флуоресцентными красителями. Стехиометрия конъюгатов регулируется соотношением реагентов; целевые продукты разделяются и очищаются с помощью электрофореза в полиакриламидном геле или высокоэффективной жидкостной хроматографией за счёт значительного отличия продуктов по молекулярной массе и заряду.
2. Оптимизированы условия гибридизации олигонуклеотид-олигонуклеотидных конъюгатов (концентрация, состав буфера, скорость охлаждения) для получения простейших дискретных ДНК-наноструктур. Разработан принцип дизайна «наномономеров», способных вступать в реакцию перегибридации по механизму замещения последовательностей с образованием циклического тетрамера – простейшей динамической ДНК-наноструктуры.
3. Предложен способ получения олигонуклеотидных конъюгатов с помощью разветвлённого тетразида, содержащих *N*-ацетилгалактозаминовые кластеры. Двухступенчатая твердофазная реакция медь(I)-катализируемого азид-алкинового циклоприсоединения позволяет получать конъюгаты, потенциально применимые для доставки в гепатоциты.
4. Разработан метод получения аптамерных кластеров (на примере EGFR-специфического аптамера), конъюгированных с цитостатическим (противоопухолевым) агентом метиллауристатином E на ферментативно-расщепляемом линкере.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах

1. **Брылёв В.А.**, Лысенко И.Л., Кокин Е.А., Мартыненко-Макаев Ю.В., Рязанцев Д.Ю., Шманай В.В., Коршун В.А. Олигонуклеотидные зонды типа «молекулярный маяк» с флуоресцеиновым бифлуорофором. *Биоорганическая химия*, **47** (3), 365–372 (2021). <https://doi.org/10.31857/S0132342321030052>
Engl. transl.: **Brylev V.A.**, Lysenko I.L., Kokin E.A., Martynenko-Makaev Y.V., Ryazantsev D.Y., Shmanai V.V., Korshun V.A. Molecular beacon DNA probes with fluorescence bifluorophore. *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **47** (3), 734–740 (2021). <https://doi.org/10.1134/S1068162021030055>
2. **Brylev V.A.**, Ustinov A.V., Tsvetkov V.B., Barinov N.A., Aparin I.O., Sapozhnikova K.A., Berlina Y.Y., Kokin E.A., Klinov D.V., Zatsepin T.S., Korshun V.A. Toehold-mediated selective assembly of compact discrete DNA nanostructures. *Langmuir*, **36** (49), 15119–15127 (2020). <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c02696>
3. Sapozhnikova K.A., Slesarchuk N.A., Orlov A.A., Khvatov E.V., Radchenko E.V., Chistov A.A., Ustinov A.V., Palyulin V.A., Kozlovskaya L.I., Osolodkin D.I., Korshun V.A., **Brylev V.A.** Ramified derivatives of 5-(perylene-3-ylethynyl) uracil-1-acetic acid and their antiviral properties. *RSC Adv.*, **9** (45), 26014–26023 (2019). <https://doi.org/10.1039/C9RA06313G>
4. Farzan V.M., Ulashchik E.A., Martynenko-Makaev Y.V., Kvach M.V., Aparin I.O., **Brylev V.A.**, Prikazchikova T.A., Maklakova S.Y., Majouga A.G., Ustinov A.V., Shipulin G.A., Shmanai V.V., Korshun V.A., Zatsepin T.S. Automated solid-phase click synthesis of oligonucleotide conjugates: from small molecules to diverse *N*-acetylgalactosamine clusters. *Bioconjugate Chem.*, **28** (10), 2599–2607 (2017). <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00462>

5. Ponomarenko A.I., **Brylev V.A.**, Sapozhnikova K.A., Ustinov A.V., Prokhorenko I.A., Zatsepin T.S., Korshun V.A. Tetrahedral DNA conjugates from pentaerythritol-based polyazides. *Tetrahedron*, **72** (19), 2386–2391 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.tet.2016.03.051>
6. Ponomarenko A.I., **Brylev V.A.**, Nozhevnikova E.V., Korshun V.A. Recent advances in self-assembled fluorescent DNA structures and probes. *Curr. Top. Med. Chem.*, **15** (13), 1162–1178 (2015). <https://doi.org/10.2174/1568026615666150330110131>

Тезисы конференций и симпозиумов

1. Anna Ponomarenko, **Vladimir Brylev**, Ksenia Sapozhnikova, Alexey Ustinov, Dmitry Klinov, Nikolay Barinov, Timofey Zatsepin, Igor Prokhorenko, Dmitry Ryasantsev and Vladimir Korshun, Branched building blocks for DNA nanotechnology, Foundations of Nanoscience Meeting (FNANO 2015), April 13–16, 2015, Snowbird, Utah, USA
2. E. Ulaschik, V. Farzan, Y. Martynenko, I. Aparin, **V. Brylev**, A. Ustinov, G. Shipulin, A. Majouga, V. Kotelianski, V. Shmanai, V. Korshun, T. Zatsepin. Synthesis of oligonucleotide conjugates by solid phase CuAAC: application to GalNAc dendrimers and dye labelling, XXII International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, July 18–22, 2016, Paris, France
3. **В.А. Брылёв**, В.А. Коршун, Т.С. Зацепин, А.В. Устинов. Синтез разветвленных ДНК-блоков на основе ди-, три- и тетраазидов с помощью медь-катализируемой реакции азид-алкинового циклоприсоединения, XXVIII зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии" ИБХ РАН, 8–11 февраля, 2016 г., Москва, Россия
4. **В.А. Брылёв**, В.А. Коршун, Т.С. Зацепин, А.В. Устинов. Получение дискретных ДНК-наноструктур гибридизацией разветвленных олигонуклеотид-олигонуклеотидных конъюгатов, XXIX зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии" ИБХ РАН, 7–10 февраля, 2017, Москва, Россия
5. **Brylev V.A.**, Ustinov A.V., Barinov N.A., Klinov D.V., Martynenko-Makaev Yu.V., Zatsepin T.S., Berlina Y.Y., Sapozhnikova K.A., and Korshun V.A. Nanostructured discrete monomers and their DNACopolymerization, III International Workshop on Electromagnetic Properties of Novel Materials, 18–20 December, 2018, Skolkovo Institute of Science and Technology Moscow, Russia
6. Kokin E.A., Martynenko-Makaev Yu.V., Zatsepin T.S., Berlina Ya.Yu., Korshun V.A., and **Brylev V.A.** Novel aminotriazide-based pathway to oligonucleotide dendrimers, III International Workshop on Electromagnetic Properties of Novel Materials, 18–20 December, 2018, Skolkovo Institute of Science and Technology Moscow, Russia
7. **В.А. Брылёв**, К.А. Сапожникова, А.В. Устинов. Олигонуклеотидные дендримеры на основе разветвленных азидов, V Всероссийская с международным участием конференция по органической химии, 10–14 сентября, 2018, Владикавказ, Россия
8. **В.А. Брылёв**, В.А. Коршун, Т.С. Зацепин, К.А. Сапожникова, И.О. Апарин, Я.Ю. Берлина, А.В. Устинов, Получение ДНК-полимера из днк-наномономеров, IV междисциплинарный симпозиум по медицинской, органической, биологической химии и фармацевтике, 23–26 сентября, 2018, Новый Свет, Крым, Россия
9. **В.А. Брылёв**, Е.А. Кокин, В.А. Коршун, К.А. Сапожникова, Т.С. Зацепин, А.В. Устинов, Флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные дендримеры, V Междисциплинарная конференция «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии», 15–18 сентября, 2019, Судак, Крым, Россия
10. **Брылёв В.А.**, Сапожникова К.А., Гуляк Е.Л., Головин А.В., Копылов А.М., Павлова Г.В., Пронин И.Н., Коршун В.А. Разветвленные конъюгаты аптамера GR20 к рецептору EGFR, V Всероссийская конференция «Физико-химическая биология», 9–12 июля, 2024, Новосибирск, Россия