

*На правах рукописи*



**КОРШУН Владимир Аркадьевич**

**МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ПИРИМИДИНОВЫЕ НУКЛЕОЗИДЫ  
И НЕНУКЛЕОЗИДНЫЕ РЕАГЕНТЫ  
В СИНТЕЗЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ КОНЪЮГАТОВ,  
ИХ СВОЙСТВА И ПРИМЕНЕНИЕ**

02.00.10 – Биоорганическая химия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
доктора химических наук

Москва – 2012

Работа выполнена в Группе генетической инженерии интерлейкинов, Лаборатории механизмов экспрессии генов, Лаборатории химии нуклеиновых кислот, Лаборатории органического синтеза и Группе биоконъюгации **Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН)**

Официальные оппоненты:

доктор химических наук, профессор  
**Мария Николаевна Преображенская**  
(Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе РАМН)

доктор химических наук, профессор  
**Татьяна Семеновна Орецкая**  
(Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова)

доктор химических наук, профессор  
**Николай Владимирович Бовин**  
(ИБХ РАН)

Ведущая организация **Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН**

Защита состоится 22 февраля 2012 г. в 10.00 на заседании диссертационного совета Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИБХ РАН

Автореферат разослан 20 января 2012 г.

Ученый секретарь диссертационного совета  
доктор физико-математических наук



В.А. Олейников

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Нуклеиновые кислоты (НК) являются носителем наследственной информации живых организмов. Фундаментальное свойство нуклеиновых кислот – комплементарность – даёт возможность короткими фрагментами НК (15–20 нуклеотидов) осуществлять специфичное узнавание последовательностей. Такие фрагменты НК (олигонуклеотиды) являются мощными инструментами исследований в области молекулярной и физико-химической биологии, медицинской диагностики и биотехнологии. Огромное значение имеют модифицированные олигонуклеотиды. В зависимости от целей использования модификации могут носить самый различный характер. Например, к олигонуклеотиду могут быть ковалентно присоединены флуоресцентные красители и тушители флуоресценции, аффинные, спиновые, хемилюминесцентные и электрохимические метки, пептиды и белки, холестерин и другие липиды, углеводы, полиэтиленгликоль, антибиотики, интеркаляторы, бороздочные лиганды, метаболиты токсичных и канцерогенных соединений и т.д. Модификации могут вводиться в терминальные положения олигонуклеотида или в его среднюю часть, по нуклеиновым основаниям, сахарам или фосфатам, а также в виде псевдонуклеозидов, заменяющих природные нуклеозиды.

Для введения ковалентных модификаций в НК существуют несколько достаточно общих подходов. *Первый способ* – это получение модифицированного нуклеозида или нуклеотидного реагента в виде амидофосфитного производного или твердофазного носителя и его введение в растущую нуклеотидную цепь в процессе автоматизированного олигонуклеотидного синтеза. В этом случае на модификацию накладываются ограничения – она должна быть совместима с химией олигонуклеотидного синтеза. *Второй способ* – обработка немодифицированной НК или олигонуклеотида реакционноспособным производным модификатора, ковалентно присоединяющимся к полинуклеотидной цепи. В этом случае модификация осуществляется статистически. *Третий способ* состоит в использовании ферментов нуклеинового обмена для включения в НК модифицированных нуклеозидов, например, встраивание нуклеозид-5'-трифосфатов в синтезирующуюся на НК-матрице растущую цепь с помощью полимераз. *Четвёртый способ* состоит в первоначальном введении в НК или олигонуклеотид реакционноспособной группы, что может быть осуществлено первыми тремя способами. По этой группе далее проводят мечение производными модификатора. Этот способ называется постмодификацией, или постмечением. Такой ступенчатый метод часто требует больших затрат труда и времени, но является наиболее гибким, поскольку для любого типа модификации можно подобрать подходящую химию присоединения.

Среди модификаций НК наиболее востребовано и практически значимо присоединение флуоресцентных красителей. Особенно широко флуоресцентное мечение используется в синтезе

флуоресцентных зондов для полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) и флуоресцентных праймеров для секвенирования НК. В качестве флуоресцентных красителей наиболее часто используются ксантеновые (флуоресцеины, родамины) и цианиновые флуорофоры.

Отдельный интерес представляют флуоресцентные красители на основе полициклических ароматических углеводородов (ПАУ), прежде всего пирена. *Во-первых*, присоединение пирена некоторым образом моделирует модификацию ДНК наиболее известным канцерогенным метаболитом – диолэпоксидом бенз[а]пирена, поскольку его аддукт с ДНК представляет собой производное 1,2-дизамещённого пирена. *Во-вторых*, в водных растворах флуоресценция пирена и ПАУ в составе НК сильно зависит от микроокружения, так как полициклические ароматические углеводороды способны к нековалентным взаимодействиям с НК. При сближении двух остатков пирена на расстояние  $\sim 3.5 \text{ \AA}$  происходит образование эксимера (сокращ. excited dimer – возбужденный димер). Эксимеры детектируются по характерной длинноволновой флуоресценции. Поскольку флуоресценция пиренового эксимера возможна только при прямом контакте остатков пирена, пиреновую пару используют как уникальный «зонд соседства» для биомолекул. Кроме того, изменения в спектрах флуоресценции ПАУ соответствуют изменениям микроокружения, вызванными взаимодействиями НК. Это делает флуорофоры на основе ПАУ ценным инструментом для изучения изменений пространственной структуры НК в ходе гибридизации с образованием дуплексов и триплексов, а также при взаимодействии с белками, пептидами и смешанными биополимерами.

Несмотря на успехи в области модификации НК и разнообразие описанных реагентов и методов, число удобных и надёжных подходов относительно невелико. Кроме того, в области олигонуклеотидных конъюгатов постоянно возникают новые задачи. Поэтому разработка новых эффективных реагентов является весьма актуальной.

**Цель работы.** Совершенствование методологии получения олигонуклеотидных конъюгатов, представляющих интерес как объекты и инструменты исследования и анализа в молекулярной биологии, биотехнологии и медицине.

Основными задачами данной работы являются:

1. Расширение набора флуоресцентных красителей для модификации НК, синтез новых фотостойких эксимеробразующих флуоресцентных красителей на основе ПАУ, разработка на основе флуорофоров новых реагентов и эффективных методов модификации, исследование взаимодействия флуорофоров с ДНК и друг с другом.

2. Разработка принципиально новых меток для нуклеиновых кислот – отщепляемых меток, детектируемых с помощью масс-спектрометрии.

3. Увеличение эффективности постмодификации олигонуклеотидов с помощью новых

методов, в частности, Cu (I)-катализируемой реакции [3+2] диполярного циклоприсоединения азидов и алкинов.

4. Разработка усовершенствованных реагентов на основе известных красителей (ксантеновых и цианиновых) – как для прямого мечения, так и для постмодификации.

Важным современным требованием к реагентам является их *универсальность* – возможность использования ограниченного набора реагентов для конструирования самых разнообразных олигонуклеотидных конъюгатов.

**Научная новизна и практическая ценность работы.** Синтезировано большое число реагентов для модификации НК – введения функциональных и реакционноспособных групп, биотина, масс-спектрометрических и флуоресцентных меток. Были предложены новые флуоресцентные метки на основе ПАУ и их фенилэтильных производных, обнаружена способность ряда соединений пирена образовывать эксимеры в большой бороздке ДНК, получены флуоресцентные и эксимеробразующие зонды, пригодные для гомогенной флуоресцентной детекции гибридизации, определения однонуклеотидных замен и дискриминации мутаций. Исследованы спектральные и фотофизические свойства флуоресцентных ПАУ в олигонуклеотидных зондах различного дизайна, с присоединением меток по сахару или нуклеиновому основанию (в том числе впервые предложено сопряжение флуоресцентного красителя с основанием с помощью тройной связи). Использование для присоединения флуоресцентных красителей к олигонуклеотидам Cu (I)-катализируемой реакции [3+2] диполярного циклоприсоединения азидов и алкинов позволяет получать зонды для ПЦР-РВ высокого качества. Разработаны практически значимые реагенты для мечения олигонуклеотидов масс-спектрометрически детектируемыми метками на основе *S*-триарилметильных соединений. Флуоресцентные 5-арилэтинил-пиримидиновые нуклеозиды представляют собой новый класс аналогов нуклеозидов, обладающих значительной противовирусной активностью по отношению к оболочечным вирусам.

**Апробация работы.** Материалы диссертации были доложены на 44 конференциях и симпозиумах, основными из которых являются 5-й Всемирный конгресс по биосенсорам (Берлин, 1998), 11-й Европейский симпозиум по органической химии (Гётеборг, 1999), 7-я Конференция по методам и применению флуоресценции (Амстердам, 2001), 5-й Кембриджский симпозиум «Химия и биология нуклеиновых кислот» (Кембридж, 2003), XVII Менделеевский съезд по общей и прикладной химии (Казань, 2003), Международные круглые столы по нуклеозидам и нуклеотидам (XII – Ла Хойя, 1996, XIII – Монпелье, 1998, XVI – Миннеаполис, 2004, XVII – Берн, 2006, XIX – Лион, 2010), Международный симпозиум «Прогресс в синтетической и медицинской химии» (Санкт-Петербург, 2007), Международные конференции по противовирусным исследованиям (XVI – Саванна, 2003, XIX – Сан-Хуан, 2006, XX – Палм Спрингс, 2007, XXI – Монреаль, 2008,

XXII – Майами Бич, 2009, XXIV – София, 2011), конференция «Химическая биология – фундаментальные проблемы бионанотехнологии» (Новосибирск, 2009).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 66 печатных работ, которые представляют собой 6 обзорных статей, 3 главы в книгах и 57 статей в реферируемых журналах.

**Личный вклад автора.** Основные результаты работы получены лично автором или под его руководством. Автор осуществлял выбор направления исследований и дизайн реагентов, непосредственно участвовал в планировании и выполнении экспериментов, анализе полученных данных и их оформлении для публикации.

**Структура работы.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов и списка цитируемой литературы (1537 ссылок). Работа изложена на 670 страницах, содержит 156 рисунков, 149 схем и 64 таблицы.

Обзор литературы посвящён рассмотрению *двух* динамично развивающихся областей химии модифицированных НК – 1) взаимодействие и конъюгаты НК с полициклическими ароматическими углеводородами (**глава 1**) и 2) применение реакции [3+2] диполярного циклоприсоединения азидов и алкинов для модификации НК (**глава 2**).

Основная часть работы состоит из трёх разделов. В *первом разделе (глава 3)* рассматриваются ненуклеозидные модифицирующие реагенты (предназначенные как для прямого введения в олигонуклеотиды в процессе синтеза, так и для постмодификации). Во *втором разделе (глава 4)* описан синтез и применение реагентов на основе сахар-модифицированных нуклеозидов. *Третий раздел (глава 5)* посвящён нуклеозидам, несущим модификации по основанию, среди которых были обнаружены вещества с противовирусной активностью. Экспериментальная часть (глава 6) содержит методики экспериментов.

**Объекты и методы исследования.** Наибольший интерес представляют флуоресцентные красители и гомогенные методы анализа на их основе, в которых может использоваться тушение флуоресценции, резонансный перенос энергии (fluorescence (или Förster) resonance energy transfer, FRET), эмиссия эксимеров или изменение спектра флуоресценции одиночной метки в результате изменения ближайшего пространственного окружения. Для новых меток в составе олигонуклеотидов проводилось исследование их влияния на стабильность совершенных и несовершенных НК-дуплексов, а также спектральных и фотофизических свойств и изменения эмиссии конъюгатов при гибридизации. Метка для масс-спектрометрической детекции должна быть прочно присоединена к НК, чтобы конъюгат выдерживал все аналитические манипуляции. Но в момент регистрации масс-спектра метка должна эффективно отщепляться и с высокой чувствительностью детектироваться в масс-спектрометре. В настоящей работе получены реагенты как для прямого мечения олигомеров ДНК в процессе твердофазного автоматизированного

синтеза, так реагенты для постмодификации. Реагенты для прямого мечения включали ненуклеозидные модификаторы для 5'- и внутреннего мечения олигонуклеотидов, реагенты на основе 2'-модифицированных нуклеозидов (2'-алкилпроизводные, 2'-карбаматы и амиды 2'-амино-LNA – модификация по углеводной части нуклеозида) и 5-алкинил-модифицированных нуклеозидов (модификация по нуклеиновому основанию).

Содержание обсуждения результатов: \*

## **1. Ненуклеозидные реагенты**

### **1.1. Реагенты для модификации олигонуклеотидов в автоматическом синтезаторе**

- 1.1.1. Реагенты для введения в олигонуклеотиды реакционноспособных функциональных групп и нефлуоресцентных модификаций. Триарилметильные масс-спектрометрические метки
- 1.1.2. Мечение олигонуклеотидов пиреновым флуорофором. Эксимерная флуоресценция
- 1.1.3. 4-(2-Бензоксазол)толан, 1-фенилэтинилпирен и 9,10-бис(фенилэтинил)-антрацен как флуоресцентные красители для мечения олигонуклеотидов. Резонансный перенос энергии. Эксимерная флуоресценция 1-фенилэтинил-пирена в детекции однонуклеотидных замен
- 1.1.4. Реагенты для мечения олигонуклеотидов цианиновыми красителями
- 1.1.5. Реагенты для мечения олигонуклеотидов ксантоновыми красителями. Перенос энергии флуоресценции с флуоресценна на тетраметилпродамин

### **1.2. Реагенты для постмодификации**

- 1.2.1. Производные пирена: пиреновый бифлуорофор, 2- и 4-этинилпирены
- 1.2.2. Активированные эфиры красителей
- 1.2.3. Азиды точек разветвления и красителей. Блоки для сборки ДНК-наноструктур

## **2. Реагенты на основе пиримидиновых нуклеозидов, модифицированных по углеводной части**

- 2.1. Уридин-2'-карбаматы для введения модификаций в малую бороздку ДНК. Увеличение интенсивности флуоресценции пирена при гибридизации с РНК
- 2.2. *Арабино*-уридин-2'-карбаматы. Эксимеры пирена и фенилэтинилпиренов в большой бороздке ДНК
- 2.3. Эксимеробразующие зонды на основе 2'-*O*-(1-PEPy)метилпроизводных уридина
- 2.4. Зонды на основе 3-периленоильного производного 2'-амино-LNA; возрастание эмиссии при гибридизации. PEPy на 2'-амино-LNA
- 2.5. Бис- и трис(фенилэтинил)пиреноильные производные 2'-амино-LNA. Флуоресценция межцепочечных эксимеров

## **3. Реагенты на основе пиримидиновых нуклеозидов, модифицированных по основанию**

- 3.1. 5-Алкинильные производные пиримидиновых нуклеозидов. Сопряжение флуорофора с нуклеиновым основанием и возрастание эмиссии при гибридизации
- 3.2. 5-Арилэтинил-пиримидиновые нуклеозиды с объёмным ароматическим заместителем – новый класс противовирусных нуклеозидов

---

\* **Примечание.** Описанные низкомолекулярные соединения характеризовались подвижностью на ТСХ в определённых системах растворителей, температурами плавления (для кристаллических веществ), масс-спектрами (в том числе масс-спектрами высокого разрешения), данными элементного анализа (для некоторых веществ), УФ-спектрами (для некоторых веществ), <sup>1</sup>H ЯМР-спектрами, и, как правило, <sup>13</sup>C ЯМР-спектрами. Отнесение сигналов в ЯМР-спектрах осуществлялось при помощи двойного резонанса и <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H- и <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C-корреляционной спектроскопии (COSY, ROESY, HMQC, HSQC, HMBC). Олигонуклеотидные конъюгаты выделялись и очищались с помощью гель-электрофореза и обращённо-фазовой ВЭЖХ. Индивидуальность конъюгатов подтверждалась ВЭЖХ, а структура – MALDI масс-спектрами.

# СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

## 1. Ненуклеозидные реагенты

### 1.1. Реагенты для модификации олигонуклеотидов в автоматическом синтезаторе

#### 1.1.1. Реагенты для введения в олигонуклеотиды реакционноспособных функциональных групп и нефлуоресцентных модификаций. Триарилметильные масс-спектрометрические метки

Из природной аминокислоты гидроксипролина **1** синтезированы хиральные амидофосфиты **2** и **3** и твердофазные носители **4** и **5**, которые позволяют в условиях стандартного олигонуклеотидного синтеза вводить в заданное место олигонуклеотида алифатические аминогруппу и тиольную группу (схема 1).

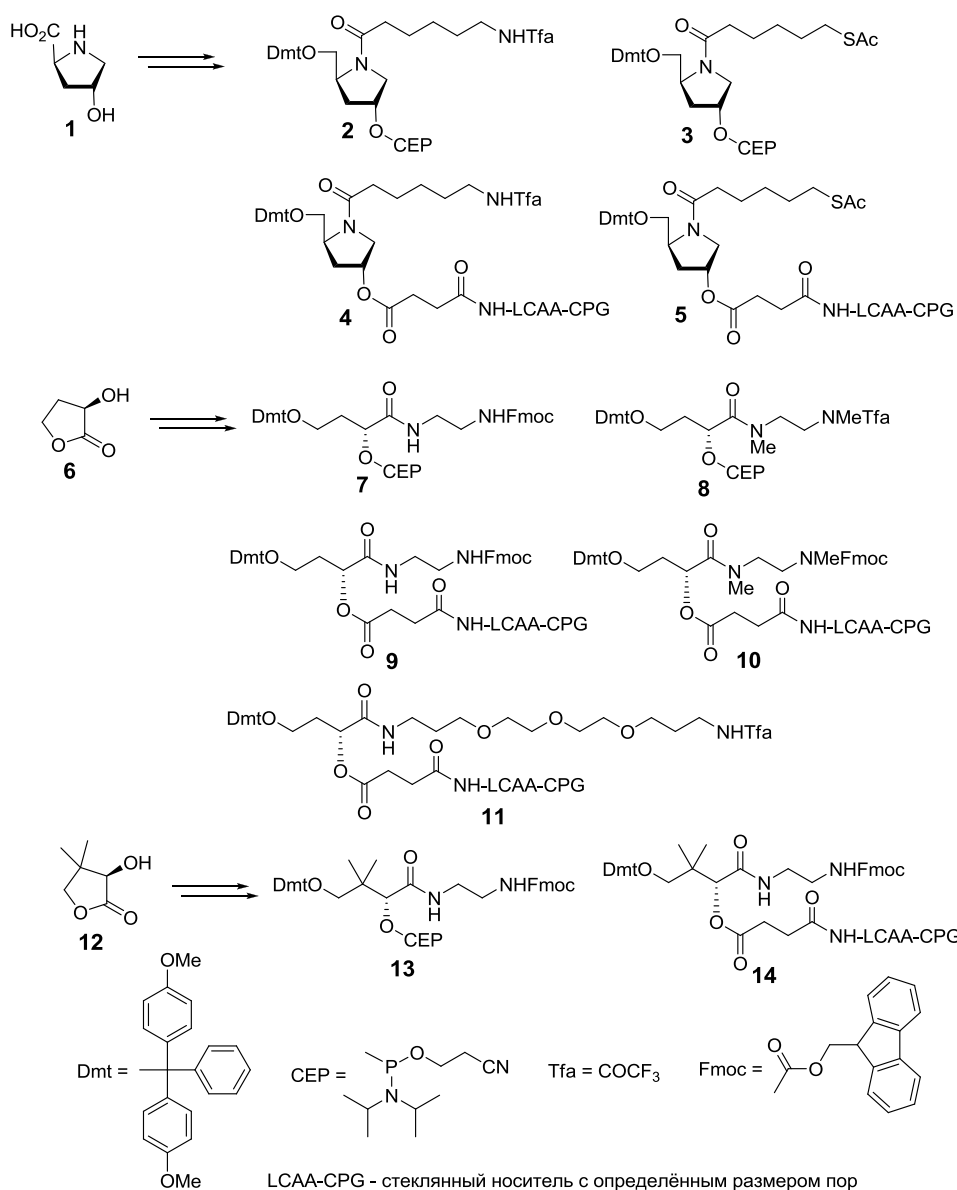


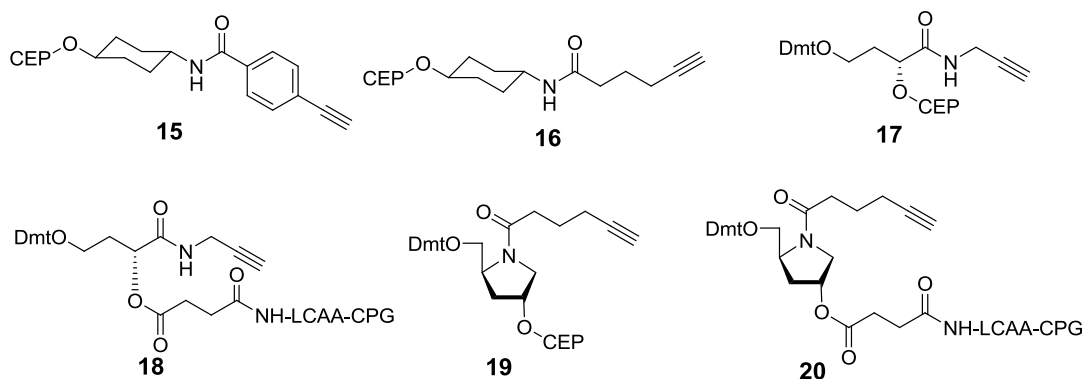
Схема 1.

Из доступных хиральных предшественников – (*R*)-(+)- $\alpha$ -гидрокси- $\gamma$ -бутиролактона **6** и (*R*)-(-)-пантолактона **12** синтезирован набор реагентов (амидофосфиты **7**, **8**, **13** и носители **9–11**, **14**)



для модификации олигонуклеотидов алифатическими первичными и вторичными аминами.

Для исследования модификации олигонуклеотидов с помощью реакции [3+2] диполярного циклоприсоединения были синтезированы реагенты **15–20**, позволяющие в процессе синтеза вводить в олигонуклеотиды остатки терминальных ацетиленов. Реагент **15** представляет собой этиниларен, а остальные реагенты – алифатические ацетилены. Амидофосфиты **15** и **16** предназначены для однократной 5'-терминальной модификации олигонуклеотидов, а реагенты **17–19** пригодны для введения в олигонуклеотиды нескольких алкиновых остатков.



Биотин **21**, витамин Н (или В7), является популярной аффинной меткой. Он обладает способностью прочно связываться с белками авидином или стрептавидином. На этом основаны разнообразные применения меченых биотином олигонуклеотидов. В первую очередь биотин используется для детекции и иммобилизации НК. Из биотина синтезированы реагенты **22–24** (схема 2), несущие биотиновый гетероцикл на достаточно длинных линкерах (что важно для эффективности связывания со (стрепт)авидином).

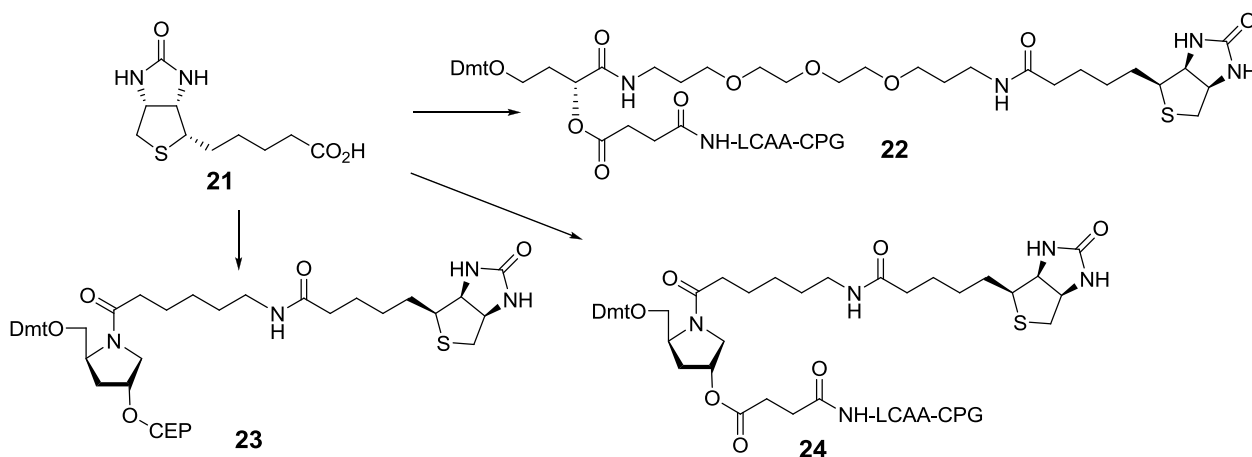
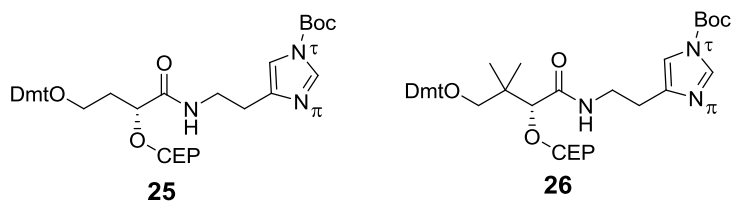


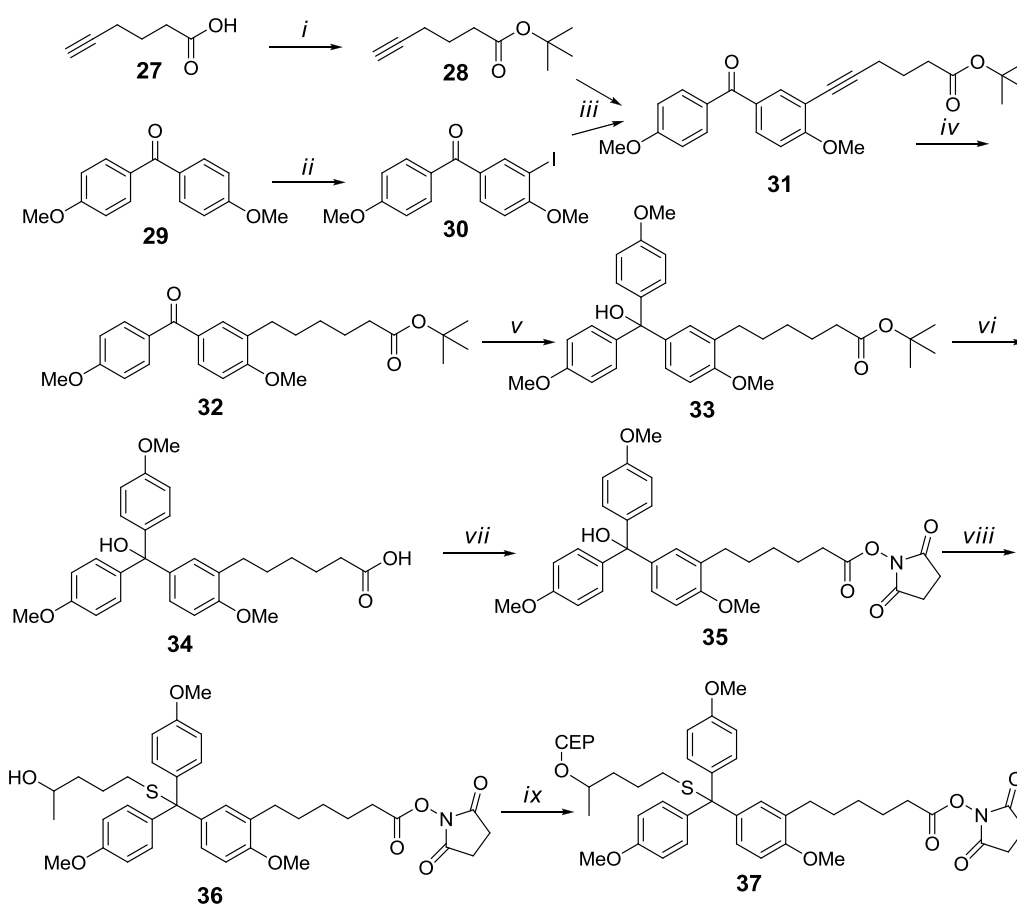
Схема 2.

Амидофосфиты **25** и **26** предназначены для модификации олигонуклеотидов остатками имидазола, что может быть применено для конструирования искусственных нуклеаз, поскольку гистидин является компонентом активных центров природных ферментов. Было установлено, что Вос-группа пригодна для защиты имидазольного остатка в процессе фосфитного триэфирного синтеза, а в процессе финального аммиачного деблокирования происходит удаление и Вос-группы. В процессе работы  $\pi$ - и  $\tau$ -изомеры разделяли хроматографией на силикагеле, но при

хранении в холодильнике нацело происходит  $\pi \rightarrow \tau$ -миграция Вос-группы. Впрочем, с точки зрения структуры конечного продукта, имидазолсодержащего олигонуклеотида, положение защитной группы в реагенте не имеет никакого значения, поскольку оба изомера при деблокировании дают один и тот же продукт.



На **схеме 3** показан синтез реагента для модификации олигонуклеотидов масс-спектрометрическими метками.



**Реагенты и условия:** (i) *tert*-бутил трихлорацетимидат,  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ , DCM, петролейный эфир, rt, 2 ч; (ii)  $\text{I}_2$ ,  $\text{HNO}_3$ , диоксан, вода,  $60^\circ\text{C}$ , 9 ч; (iii)  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ , CuI,  $\text{Et}_3\text{N}$ , rt, 16 ч; (iv)  $\text{H}_2$  (150 атм), Pd/C, EtOAc, rt, 24 ч; (v) 4-метоксифенилмагнибромид, THF, rt, 16 ч; (vi)  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ , DCM, rt, 3 ч; (vii) *N,N*-дисулцинимидилкарбонат,  $\text{Et}_3\text{N}$ , DCM, rt, 16 ч; (viii) 4-гидроксипентантиол, AcOH, rt, 2 ч; (ix)  $i\text{Pr}_2\text{NP}(\text{Cl})\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ , DIEA, DCM, rt, 2 ч.

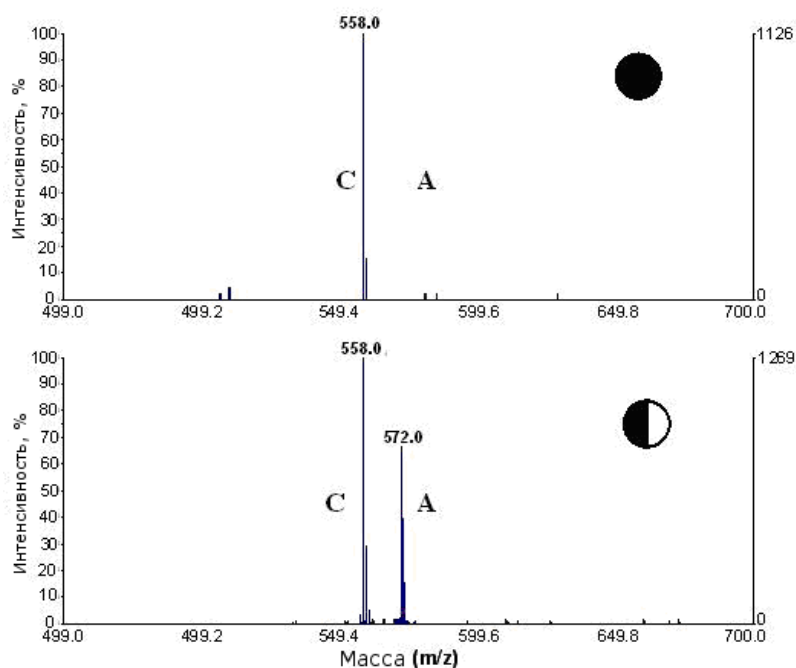
### Схема 3.

Исходными соединениями являются 5-гексиновая кислота **27** и 4,4'-диметоксибензофенон **29**. Кислота превращалась в трет-бутиловый эфир **28**, а бензофенон иодировался в моноиодпроизводное **30**. Полученные соединения в условиях Pd/Cu-катализируемой реакции Соногаширы давали кетон **31**, тройную связь в котором восстанавливали водородом в присутствии палладия. Полученное соединение **32** обрабатывали реактивом Гриньяра, получая 4,4',4''-

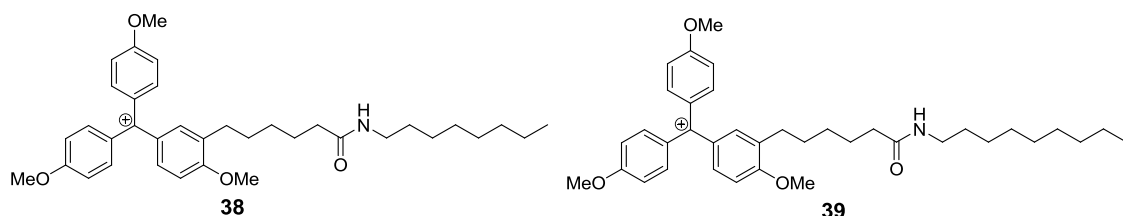
триметокситритильное производное **33**. После гидролиза сложного эфира и активирования карбоксильной группы получали вещество **35**, которое легко вступало в реакцию со спиртосодержащим тиолом. Продукт реакции **36** фосфитилировали и получали амидофосфит **37**, которым осуществляли 5'-терминальную модификацию олигонуклеотидов.

После завершения последнего синтетического цикла с участием соединения **37** олигонуклеотид на носителе обрабатывают различными аминами, которые очень быстро реагируют с активированным эфиром и образуют соответствующие амиды. После деблокирования и выделения модифицированного олигонуклеотида он используется в ферментативных реакциях, а триарилметильная метка детектируется с помощью MALDI масс-спектрометрии. Метод принципиально основан на том, что *S*-4,4',4''-триметокситритильное производное достаточно стабильно при нейтральных значениях pH и обычных биохимических манипуляциях. Но при освещении лазером в MALDI масс-спектрометре тритильное соединение отщепляется с атома серы и образуется стабилизированный 4,4',4''-триметокситритильный катион, легко детектируемый в масс-спектре. Масса этого катиона может регулироваться присоединением различных аминов к карбоксильной группе на твёрдой фазе после олигонуклеотидного синтеза. Таким образом, олигонуклеотиды различной последовательности метятся тритильными катионами одинаковой стабильности, но разной массы.

Такие метки пригодны для детекции, например, однонуклеотидных замен: проводят полимеразную достройку различных зондов по 3'-концу, а затем выделяют и анализируют продукты реакции. В масс-спектре наблюдаются сигналы, соответствующие продуктам достройки. Таким способом детектируется не только отдельные аллели, но и гетерозигота (рис. 1).



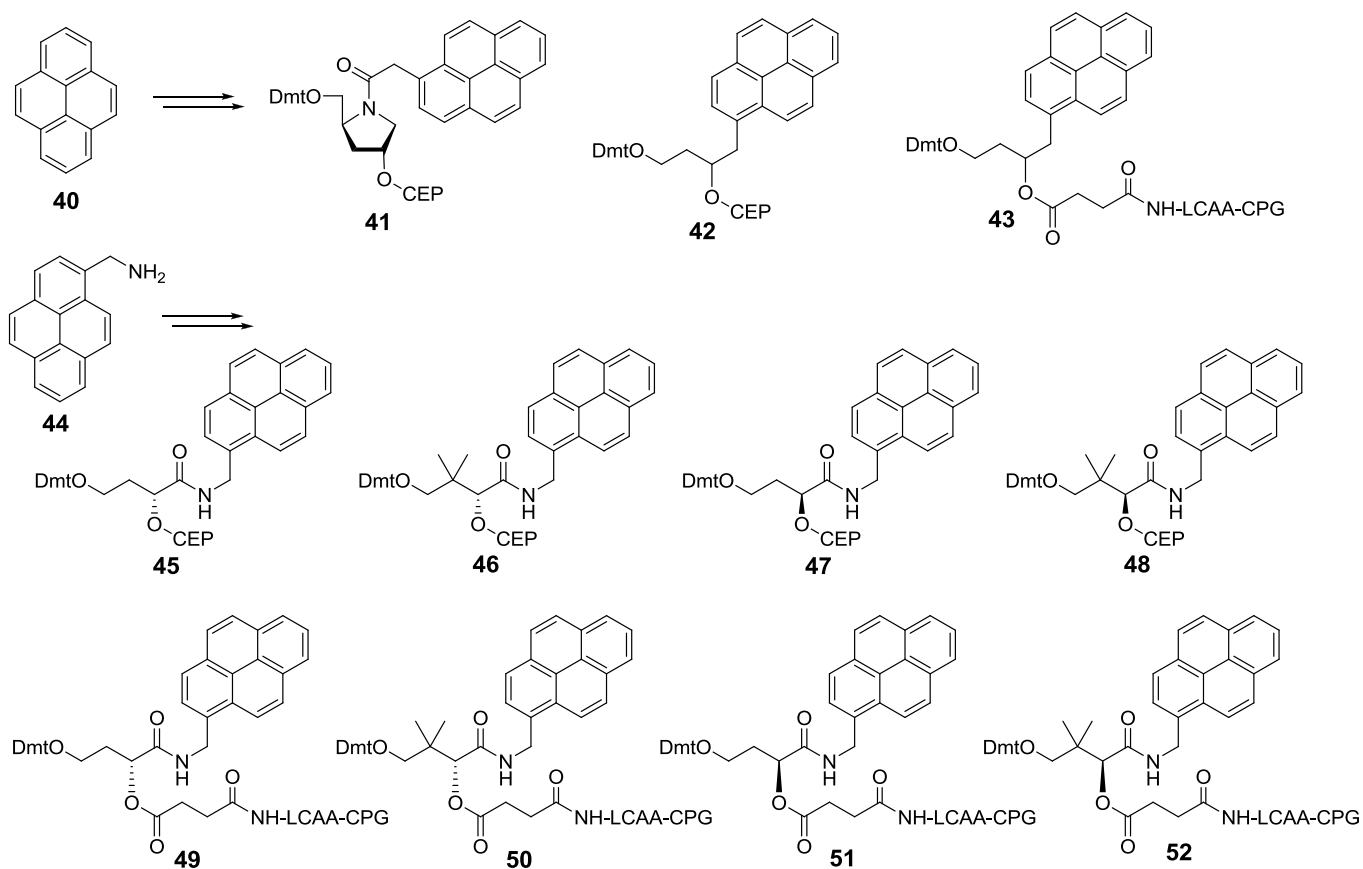
**Рис. 1.** Генотипирование с помощью MALDI масс-спектрометрии. Вверху: гомозигота; внизу: гетерозигота (присутствуют оба аллеля). Эксперимент выполнен К.Р. Бирих на гене МНСIII (LOCUS DJ201G24; M(19761) = C or A). Массы 558.0 и 572.0 соответствуют тритильным катионам **38** и **39**, соответственно.



Детектируемые катионы **38** и **39** содержат алкилы  $C_8$  и  $C_9$ , то есть различаются лишь на одну метиленовую группу. Тритильное соединение пригодно для модификации другими алифатическими аминами, что открывает перспективы одновременной детекции нескольких мутаций.

### 1.1.2. Мечение олигонуклеотидов пиреновым флуорофором. Эксимерная флуоресценция

Тетрациклический ароматический углеводород пирен **40** является флуорофором с эмиссией в коротковолновой части видимого спектра (около 400 нм) и большим временем жизни возбуждённого состояния (сотни наносекунд). При сближенном расположении двух остатков пирена электронное возбуждение может перераспределяться на пиреновый димер, который флуоресцирует уже в области 460–470 нм. Переход от мономерной к эксимерной флуоресценции легко детектируется визуально (голубое→зелёное свечение).



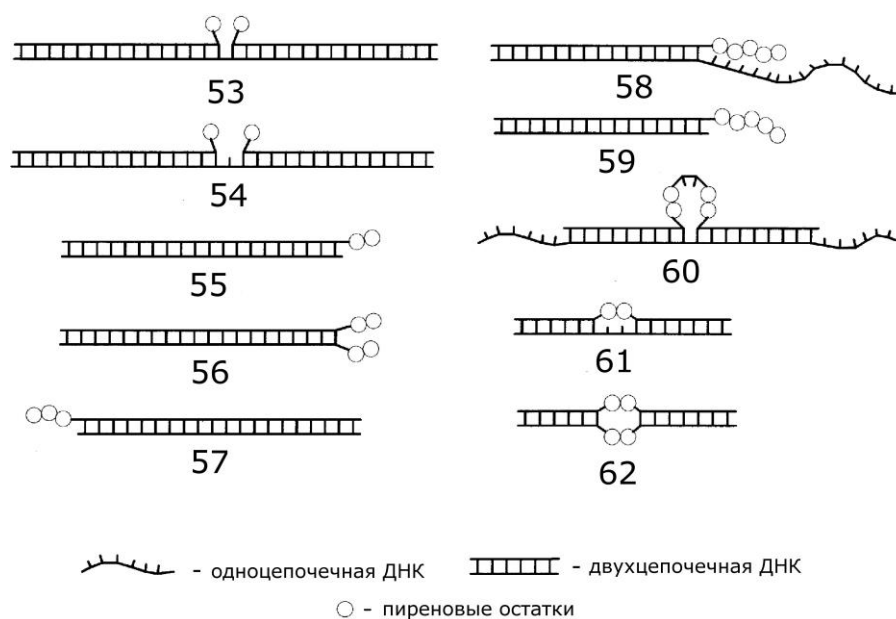
**Схема 4.**

Из пирена легко получают функциональные производные. В то же время пиреновый остаток химически инертен в условиях олигонуклеотидного синтеза. Это делает пирен весьма

удобным для прямого введения в олигонуклеотиды. Из пирена были синтезированы реагенты **41–43** для модификации пиреном любой части олигонуклеотидной последовательности (схема 4). Реагент **41** хиральный (не приводит к смеси диастереомеров), но, в отличие от нуклеозидов, содержит 4 атома углерода между двумя гидроксилами в псевдосахарном скелете. В реагентах **42** и **43** присутствует соответствующая природной трёхуглеродная цепочка, но эти реагенты представляют собой смесь энантиомеров по атому С3. Поэтому при их введении в олигонуклеотиды возникает смесь диастереомеров.

Из 1-пиренилметиламина **44** ацилированием соответствующими хиральными  $\alpha$ -гидрокси- $\gamma$ -бутиролактонами с последующей стандартной функционализацией получены хирально чистые реагенты **45–52**, в которых к тому же расстояние между гидроксилами определяется тремя атомами углерода.

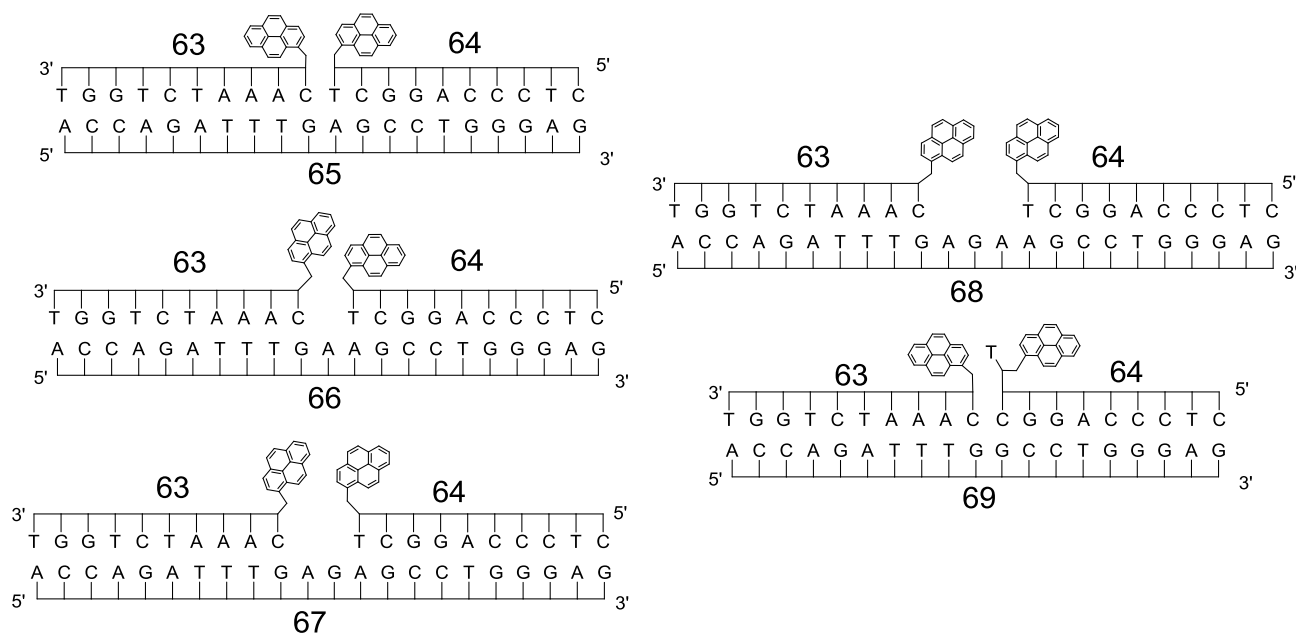
С помощью реагентов **42** и **43** синтезирован ряд олигонуклеотидов, из которых были составлены дуплексы **53–63**, схематично показанные на рис. 2. Оказалось, что как для одноцепочечных олигомеров с несколькими остатками пирена, так и для дуплексов **53–60** характерна мономерная флуоресценция. И только в случае дуплексов **61** и **62** проявляется отчётливая полоса эмиссии эксимера. Особенно интересен случай дуплекса **61**, где возможен лишь внутрицепочечный эксимер.



**Рис. 2.** Схематическое изображение дуплексов со сближенным расположением пиреновых остатков. Модифицированные олигонуклеотиды синтезированы с использованием реагентов **42** и **43**.

Конъюгат, содержащий 5 пиреновых остатков, демонстрировал аномально большое время удерживания на колонке в ВЭЖХ. Была исследована его флуоресценция в присутствии метанола. При возрастании концентрации метанола с 30 до 50% соотношение интенсивности эксимерной и мономерной флуоресценции увеличивается в примерно в 5 раз, что может свидетельствовать об образовании мицелл, в которых пиреновые остатки разных олигонуклеотидов сближаются друг с другом.

С использованием конъюгатов, синтезированных из реагентов **45–52**, было изучено образование эксимера в случае тандемной гибридизации меченых пиреном олигонуклеотидов **63** и **64** на комплементарных матрицах **65–69**. В зависимости от последовательности матрицы отличается возможность пиреновых остатков для сближения (**рис. 3**). Матрица имеет определяющее значение, но важен также тип псевдосахарной части в пиреновом мономере (**табл. 1**). Данные свидетельствуют, что в таких тандемных комплексах эксимеры наиболее эффективно образуются из (*S*)-энантиомеров 2,4-дигидроксибутирамидов (реагенты **47, 48, 51** и **52**).



**Рис. 3.** Схематическое изображение тандемных дуплексов пиреносодержащих олигонуклеотидов **63** и **64** на немодифицированных матрицах **65–69**.

**Таблица 1.** Отношение интенсивности эксимерной флуоресценции к мономерной в тандемных комплексах **63×64×матрица**.

Комплементарная матрица	$I_{470\text{нм}}/I_{400\text{нм}}$ ( $I_{\text{экс}}/I_{\text{мон}}$ ) для реагентов, использованных для введения пирена			
	<b>45, 49</b>	<b>46, 50</b>	<b>47, 51</b>	<b>48, 52</b>
<b>65</b>	0.19	0.24	0.34	0.79
<b>66</b>	0.21	0.54	0.92	0.81
<b>67</b>	0.03	0.04	0.03	0.09
<b>68</b>	0.06	0.15	0.11	0.11
<b>69</b>	0.10	0.23	0.20	0.33

### 1.1.3. 4-(2-Бензоксазолил)толан, 1-фенилэтинилпирен и 9,10-бис(фенилэтинил)-антрацен как флуоресцентные красители для мечения олигонуклеотидов. Резонансный перенос энергии. Эксимерная флуоресценция 1-фенилэтинил-пирена в детекции однонуклеотидных замен

Подход, использованный в синтезе реагентов **42** и **43**, был применён для синтеза иодарильного блока **70**, из которого функционализацией этинилараенами по реакции Соногаширы с последующим тритилированием и фосфитилированием были получены амидофосфиты **71–73** и

твердофазные носители **74–76** (схема 5). Флуорофорами в этих реагентах являются 4-(2-бензоксазолил)толан, 1-фенилэтинилпирен (1-PEPy) и 9,10-бис(фенилэтинил)антрацен (ВРЕА). Первый из флуорофоров имеет максимум поглощения при 335 нм, а максимум эмиссии при 395 нм. Таким образом, Стоксов сдвиг составляет около 60 нм, что весьма необычно для индивидуального флуорофора. 1-Фенилэтинилпирен имеет максимумы поглощения при 365 и 390 нм, а максимумы эмиссии составляют 405 и 415 нм. 9,10-Бис(фенилэтинил)антрацен поглощает при 435 и 460 нм, а флуоресцирует при 470 и 505 нм.

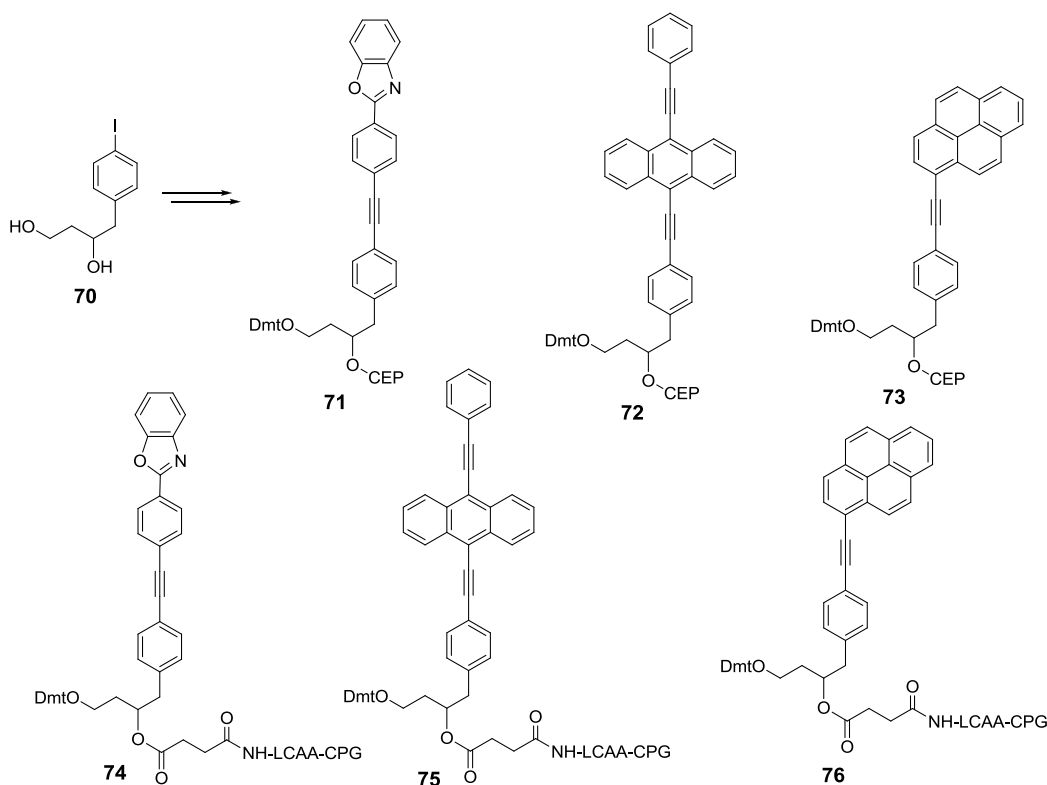


Схема 5.

Интересно, что включение 1-PEPy в середину олигонуклеотидной цепи вызывало лишь незначительное уменьшение стабильности дуплекса с комплементарной последовательностью ( $\Delta T_m = -1.4^\circ\text{C}$ ), а введение модификации в свешивающееся положение вызывало заметную стабилизацию дуплекса ( $\Delta T_m = +4.5^\circ\text{C}$ ). Было также обнаружено, что 1-PEPy является эффективным донором энергии для флуоресценции ВРЕА. Прямым доказательством переноса энергии в системе, содержащей 1-PEPy и ВРЕА на двух олигонуклеотидах, составляющих дуплекс, является регистрация в спектре возбуждения ВРЕА интенсивных сигналов в области поглощения 1-PEPy.

Оказалось, что 1-PEPy способен образовывать эксимеры. В отличие от пирена олигонуклеотид, содержащий в средней части два остатка 1-PEPy подряд, показал интенсивную эксимерную флуоресценцию. При образовании дуплекса эксимерная флуоресценция менялась на мономерную (для пиренового дуплекса **61** наблюдалась обратная картина). Это свойство зондов, содержащих бифлуорофор 1-PEPy, получаемый в синтезаторе в результате двух последовательных

синтетических циклов с реагентом **73**, оказалось полезным для разработки системы детекции однонуклеотидных замен на примере гена 23S РНК *Helicobacter pylori*.

**Таблица 2.** Модельные ДНК-матрицы и эксимеробразующие бис(1-PEPy)-зонды для разработки тест-системы детекции однонуклеотидных замен в положениях 2143 и 2144 гена 23S РНК *Helicobacter pylori*.

Фрагмент гена 23S РНК <i>H. pylori</i> (кодирующая цепь, дикий тип)		5' -GAAAAATTCCTCCTACCCGCGGCAAGACGG <sup>2143</sup> <b>AA</b> <sup>2144</sup> AGACCCCGTGGACCTTTAC-3'	
Модельные 40-звенные мишени – фрагменты некодирующей цепи	<b>77</b>	3' -TAAGGAGGATGGGCGCCGTTCTGCC <b>TT</b> TCTGGGGCACCTG-5'	
	<b>78</b>	3' -TAAGGAGGATGGGCGCCGTTCTGCC <b>CT</b> TCTGGGGCACCTG-5'	
	<b>79</b>	3' -TAAGGAGGATGGGCGCCGTTCTGCC <b>GT</b> TCTGGGGCACCTG-5'	
	<b>80</b>	3' -TAAGGAGGATGGGCGCCGTTCTGCC <b>TC</b> TCTGGGGCACCTG-5'	
Эксимеробразующие зонды	<b>81</b>		5' -GCAAGAC <b>XX</b> AAAGACCCCGT-3'
	<b>82</b>		5' -GCAAGACG <b>XX</b> AAGACCCCGT-3'
	<b>83</b>		5' -GCAAGACGG <b>XX</b> AGACCCCGT-3'
	<b>84</b>		5' -GCAAGACGG <b>AXX</b> GACCCCGT-3'

В табл. 2 показаны модельная матрица дикого типа **77**

и три матрицы **78–80**, соответствующие встречающимся в природе мутациям в положениях 2134 и 2144. Были синтезированы четыре зонда **81–84**, содержащие

фенлэтинилпиреновый бифлуорофор вблизи сайта мутаций. Изучалось изменение их флуоресценции после гибридизации с модельными матрицами. Оказалось, что с помощью зонда **82** можно выявить наличие мутации в положении 2143, а с помощью зонда **83** – в положении 2144. Эффективность

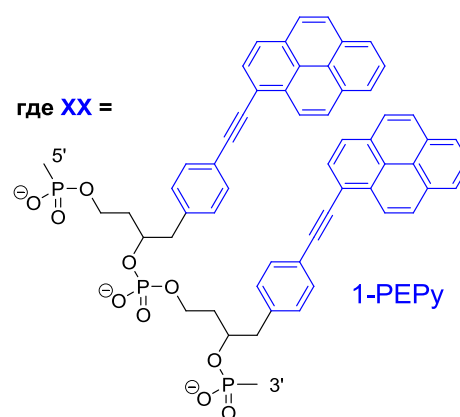
метода показана на природных изолятах штаммов *Helicobacter pylori*. Сначала фрагмент некодирующей цепи нарабатывался с помощью асимметричной ПЦР, затем проводилась гибридизация с недостатком зондов **82** и **83**, и для каждого зонда определялось соотношение интенсивности эксимерной и мономерной флуоресценции. Присутствие мутаций контролировалось секвенированием образцов. Данные приведены в табл. 3.

Сначала фрагмент некодирующей цепи нарабатывался с помощью асимметричной ПЦР, затем проводилась гибридизация с недостатком зондов **82** и **83**, и для каждого зонда определялось соотношение интенсивности эксимерной и мономерной флуоресценции. Присутствие мутаций контролировалось секвенированием образцов. Данные приведены в табл. 3.

Сначала фрагмент некодирующей цепи нарабатывался с помощью асимметричной ПЦР, затем проводилась гибридизация с недостатком зондов **82** и **83**, и для каждого зонда определялось соотношение интенсивности эксимерной и мономерной флуоресценции. Присутствие мутаций контролировалось секвенированием образцов. Данные приведены в табл. 3.

**Таблица 3.** Флуоресценция зондов после гибридизации с избытком одноцепочечного ПЦР-продукта амплификации фрагмента некодирующей цепи гена 23S РНК *Helicobacter pylori*.<sup>a</sup>

Образец	Присутствующие в образце генотипы (мутации)	Соотношение интенсивности эксимерной и мономерной флуоресценции ( $I_{510nm}/I_{405nm}$ )	
		зонд <b>82</b>	зонд <b>83</b>
1	A2143G, дикий тип	0.54	– <sup>b</sup>
2	A2144G, дикий тип	– <sup>b</sup>	1.50
3	A2143G	0.83	– <sup>b</sup>
4	A2144G	– <sup>b</sup>	1.34
5	A2144G	– <sup>b</sup>	1.34
6	A2143G, A2144G	0.30	1.47



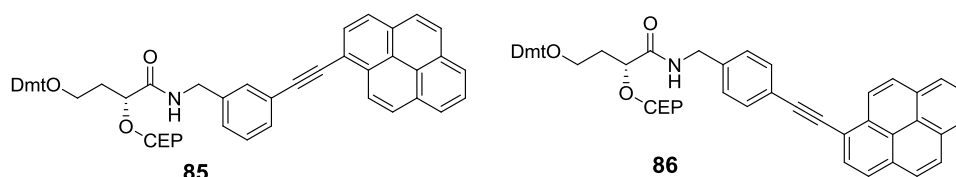


7	A2144G	– <sup>b</sup>	1.18
8	A2143G, A2143C	0.62	– <sup>b</sup>
9	A2143G	0.82	– <sup>b</sup>
10	A2143G, A2144G, дикий тип	0.43	0.97
11	A2143G	0.82	– <sup>b</sup>
12	A2143G	0.72	– <sup>b</sup>
13	A2144G	– <sup>b</sup>	1.52
14	дикий тип	– <sup>b</sup>	– <sup>b</sup>

a – Данные получены А.А. Козловой и И.А. Прохоренко.

b – Характерной полосы эксимерной эмиссии не наблюдалось.

На основе 2,4-дигидроксипиридинов были синтезированы амидофосфитные реагенты **85** и **86**, содержащие 1-фенилэтинилпиреновый флуорофор, присоединённый по положению 3 или 4 фенильного кольца. С помощью этих реагентов получены короткие дуплексы **87–90**, в которых два псевдонуклеозида замещают нуклеозиды в различных цепях, и изучено образование эксимера в зависимости от взаимного расположения красителей (табл. 4).



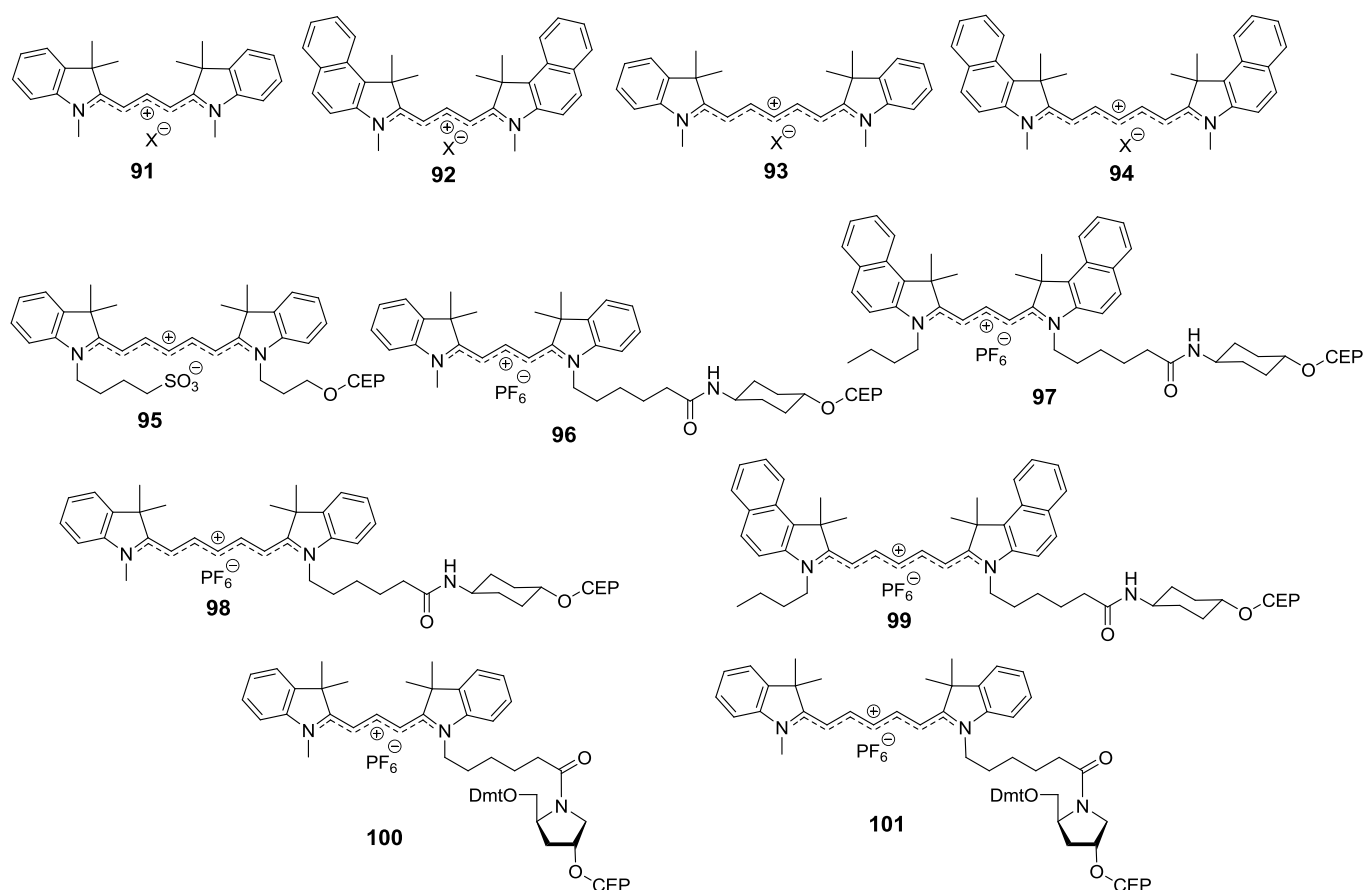
**Таблица 4.** Флуоресценция 15-звенных дуплексов, содержащих 1-PEPy-псевдонуклеозиды: **M** – звено *мета*-присоединённого 1-PEPy (из реагента **85**); **P** – звено *пара*-присоединённого 1-PEPy (из реагента **86**).

Дуплекс	Расположение остатков красителя	Эксимерная эмиссия	Модель дуплекса
<b>87</b>	$  \begin{array}{c}  5' \quad \quad \quad 3' \\  -N-N-M-N- \\    \quad   \quad   \\  -N-N-M-N- \\  3' \quad \quad \quad 5'  \end{array}  $	+	
<b>88</b>	$  \begin{array}{c}  5' \quad \quad \quad 3' \\  -N-N-M-N- \\    \quad   \quad   \\  -N-M-N-N- \\  3' \quad \quad \quad 5'  \end{array}  $	–	
<b>89</b>	$  \begin{array}{c}  5' \quad \quad \quad 3' \\  -N-N-P-N- \\    \quad   \quad   \\  -N-N-P-N- \\  3' \quad \quad \quad 5'  \end{array}  $	–	
<b>90</b>	$  \begin{array}{c}  5' \quad \quad \quad 3' \\  -N-N-P-N- \\    \quad   \quad   \\  -N-P-N-N- \\  3' \quad \quad \quad 5'  \end{array}  $	+	

Молекулярное моделирование подтверждает, что для проявления эксимерной флуоресценции *мета*- и *пара*-присоединённые к псевдосахарному остатку красители должны по-разному располагаться в комплементарных цепях ДНК-дуплекса (табл. 4).

#### 1.1.4. Реагенты для мечения олигонуклеотидов цианиновыми красителями

Цианиновые красители 3,3,3',3'-тетраметил-2,2'-(бензо)индо(ди)карбоцианины  $Cu3$  (**91**),  $Cu3.5$  (**92**),  $Cu5$  (**93**),  $Cu5.5$  (**94**) являются популярными флуоресцентными метками для биомолекул. На основе цианиновых красителей были синтезированы амидофосфитные реагенты для 3'-терминального мечения олигонуклеотидов в автоматическом синтезаторе. Сначала был получен цвиттерионный амидофосфитный реагент **95** на основе красителя  $Cu5$ . Но оказалось, что он обладает умеренной стабильностью в ацетонитрильном растворе в олигонуклеотидном синтезаторе, поскольку амидофосфит является производным первичного спирта. Кроме того, по-видимому, сульфонат способствует деградации красителя в процессе финальной аммиачной обработки и поэтому её приходилось проводить при пониженной температуре.

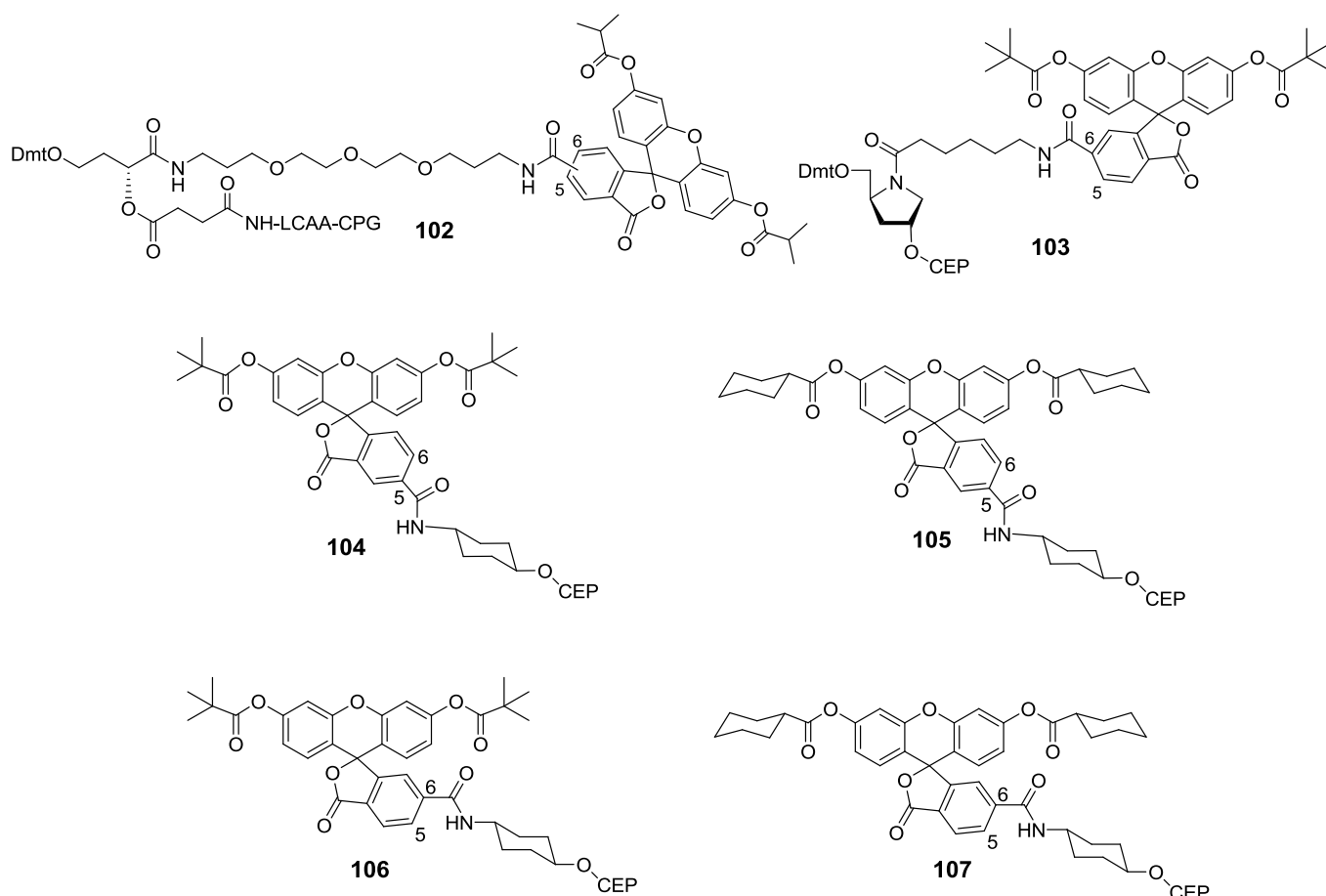


С целью повышения эффективности мечения были синтезированы реагенты на основе красителей  $Cu3$  (**96**),  $Cu3.5$  (**97**),  $Cu5$  (**98**),  $Cu5.5$  (**99**), у которых предшественником амидофосфитной функции является вторичный спирт. Красители из реагентов **96** и **97** вполне устойчивы к аммиачному деблокированию, а деблокирование олигонуклеотидов, меченных с помощью реагентов **98** и **99** следует проводить при комнатной температуре. Краситель  $Cu5$  из

реагента **98** более устойчив к аммиаку, чем Су5 из реагента **95**. Были получены также амидофосфиты **100** и **101**, эффективность конденсации которых можно измерять по поглощению отщепляемого кислотой диметокситритильного катиона.

### 1.1.5. Реагенты для мечения олигонуклеотидов ксантеновыми красителями. Перенос энергии флуоресценции с флуоресцеина на тетраметилродамин

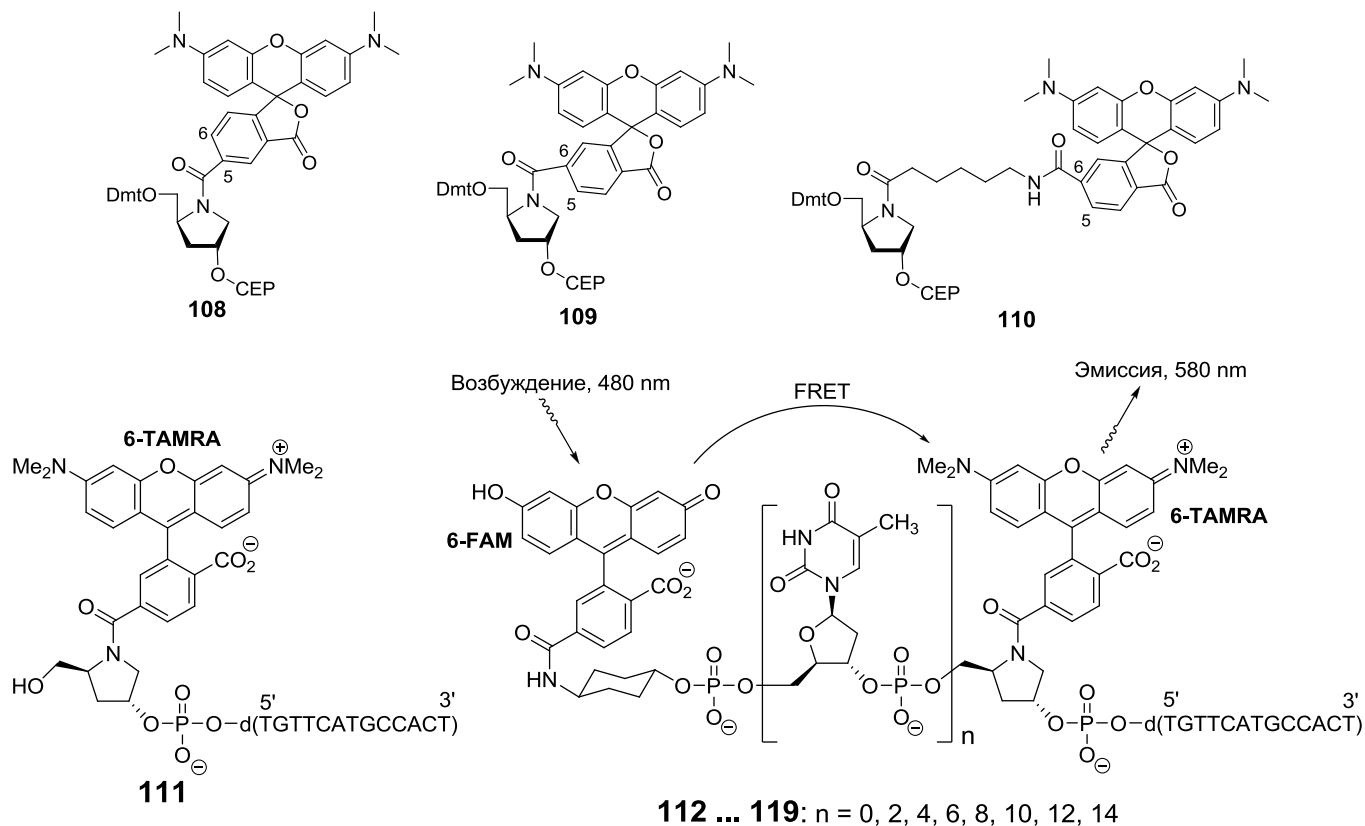
Для мечения олигонуклеотидов ксантеновым красителем флуоресцеином синтезированы носитель **102** и амидофосфиты **103–107**. Для реагентов использовались смесь 5- и 6-карбоксифлуоресцеинов (**102**) или индивидуальные изомеры – 5-карбоксифлуоресцеин (**104, 105**) и 6-карбоксифлуоресцеин (**103, 106, 107**). Реагенты для терминального мечения **104** и **105**, а также **106** и **107** отличаются друг от друга типом защитной группы на фенольных гидроксилах флуоресцеина – использовалась пивалоильная или циклогексилкарбонильная группа. Как защитные группы для олигонуклеотидного синтеза они одинаково эффективны, но циклогексилкарбонильная защита позволяет более эффективно проводить хроматографическое разделение 5- и 6-изомеров карбоксифлуоресцеинов на предыдущих стадиях.



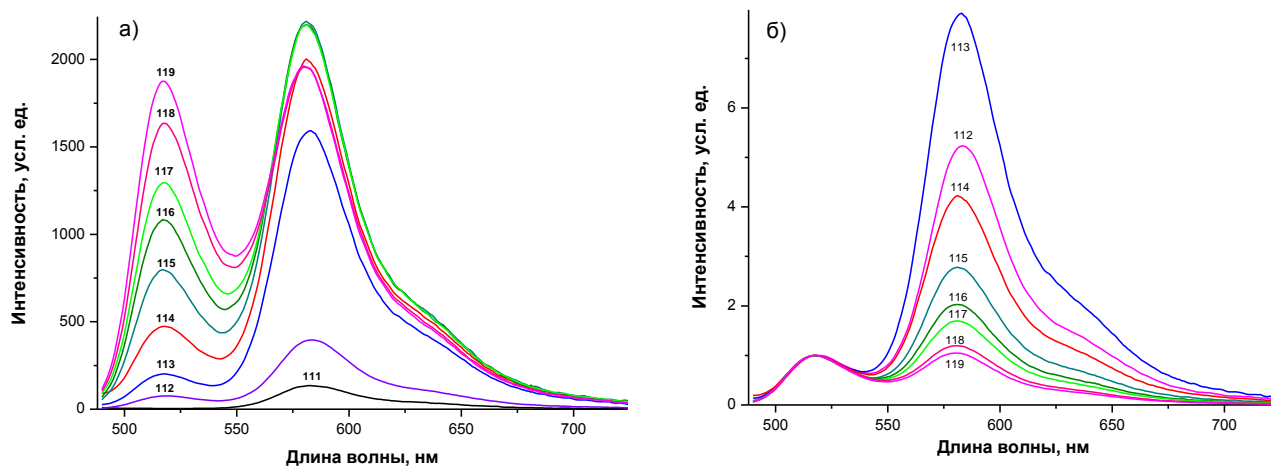
Для мечения олигонуклеотидов тетраметилродамином синтезированы амидофосфитные реагенты **108–110**. Был разработан способ синтеза индивидуальных изомеров 5- и 6-карбокситетраметилродамина, исходных красителей для синтеза этих реагентов.

Поскольку известно, что флуоресцеин (FAM) и тетраметилродамин (TAMRA) являются донорно-акцепторной парой, то с использованием реагентов **106** и **109** был синтезирован ряд

олигонуклеотидов, содержащих одновременно FAM и TAMRA, разделённые различным числом тимидиновых нуклеотидов (**рис. 4**). Представляло интерес выяснить, при какой структуре линкера эффективность переноса энергии максимальна.



**Рис. 4.** Структура TAMRA- и FAM-TAMRA-меченых олигонуклеотидов **111–119**.



**Рис. 5.** а) Спектры флуоресценции олигонуклеотидов **111–119** в 0.1 М бикарбонатном буфере (pH 8.5), возбуждение при  $\lambda = 480$  нм, концентрация  $6 \times 10^{-7}$  М; б) спектры флуоресценции олигонуклеотидов **106–113** нормализованные по максимуму флуоресценции 6-FAM (519 нм).

Наибольшее соотношение интенсивностей флуоресценции TAMRA/FAM (581 нм/519 нм) наблюдалось для конъюгата **113**, а не **112** (7.9 против 5.2). Это соотношение быстро уменьшается в ряду **113...119** (табл. 5, рис. 5б). Конъюгат **113** излучает 90% интегральной световой энергии в полосе флуоресценции TAMRA (550–650 нм), а 10% – в полосе флуоресценции FAM (500–550 нм). Однако, общая интенсивность излучения поглощённого света (суммарная эмиссия FAM +

TAMRA) уменьшается в ряду **119**>**118**≈**117**>**116**>**115**>**114**>**113**>>**112** (рис. 5а). Таким образом, конъюгаты **115–117** демонстрируют наибольшую интенсивность эмиссии TAMRA, **119** – наибольшую интенсивность суммарной эмиссии FAM+TAMRA, а **113** – наибольшее соотношение интенсивности эмиссий TAMRA/FAM. Эти данные могут оказаться полезными для дизайна зондов и праймеров с внутримолекулярным переносом энергии.

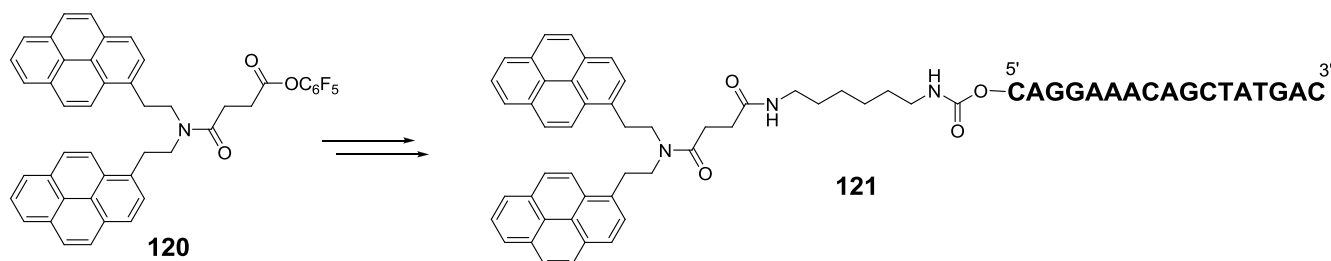
**Таблица 5.** Спектральные свойства олигонуклеотидов, меченых флуоресцеином и тетраметилродамином.

#	n	Донор (6-FAM) $\lambda_{\max}^{abs}$ , нм	Акцептор (6-TAMRA) $\lambda_{\max}^{fl}$ , нм	$I_{(TAMRA)}/I_{ET-(TAMRA)}$ <sup>b</sup>	$I_{(TAMRA)}/I_{(FAM)}$ <sup>c</sup>
<b>111</b>	-	-	583	1.0	-
<b>112</b>	0	497	583	2.9	5.2
<b>113</b>	2	493	583	11.8	7.9
<b>114</b>	4	494	581	14.9	4.2
<b>115</b>	6	495	581	16.5	2.8
<b>116</b>	8	495	581	16.3	2.0
<b>117</b>	10	495	581	16.3	1.7
<b>118</b>	12	495	580	14.5	1.2
<b>119</b>	14	495	580	14.6	1.0

## 1.2. Реагенты для постмодификации

### 1.2.1. Производные пирена: пиреновый бифлуорофор, 2- и 4-этинилпирены

Для исследования взаимодействия пирена с ДНК был синтезирован активированный эфир пиренового бихромофора **120**. Ацилированием аминопроизводного олигонуклеотида на твёрдой фазе с последующим аммиачным деблокированием был получен конъюгат **121** (схема 6). Оказалось, что несмотря на выгодное для образования эксимера пространственное сближение двух пиреновых остатков, конъюгат **121** не показал длинноволновой эмиссии. Эксимерный сигнал был виден лишь в спектре флуоресценции дуплекса олигонуклеотида **121** с комплементарной последовательностью в присутствии 25% метанола.

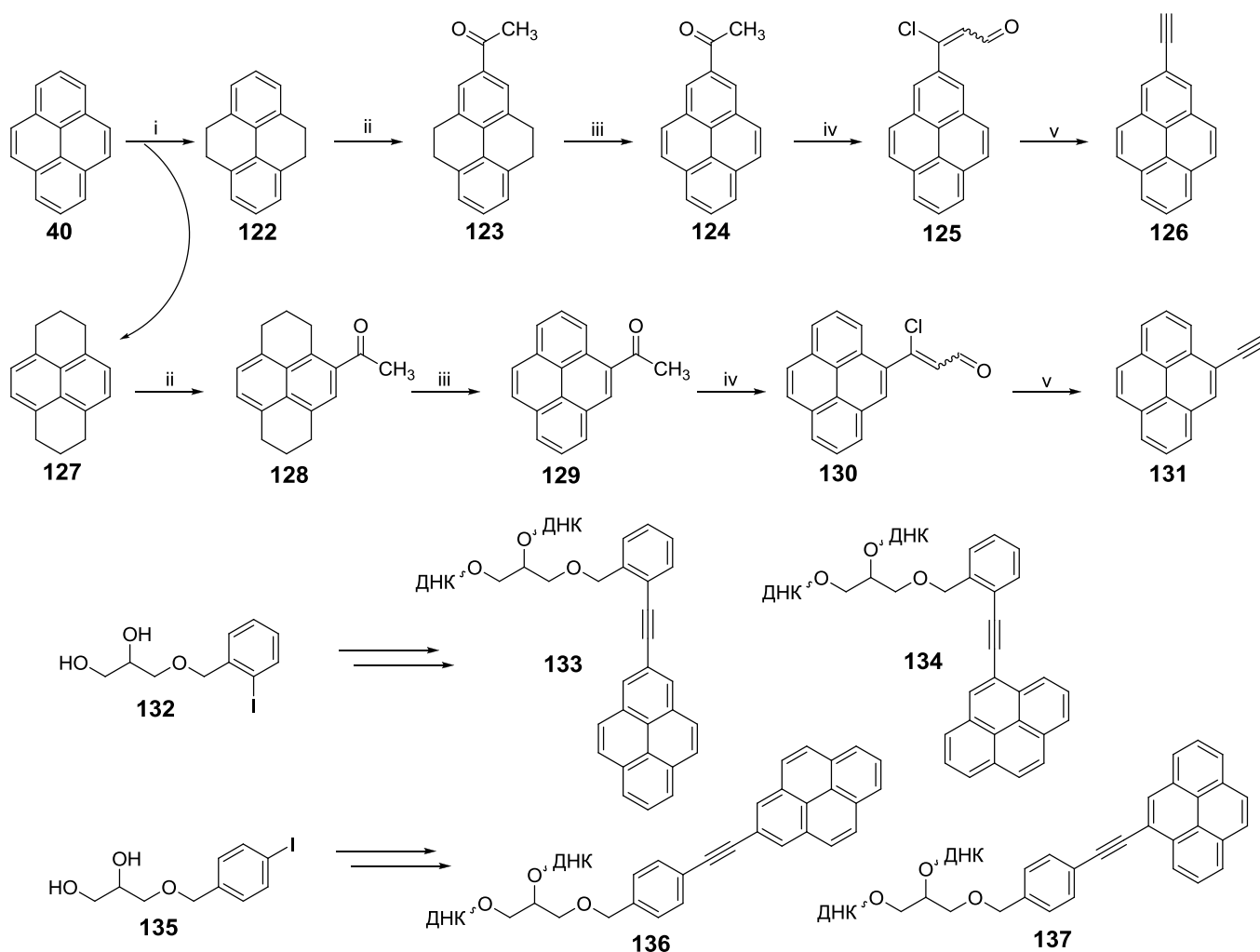


**Схема 6.**

Такое изменение спектра флуоресценции при гибридизации свидетельствует о том, что остаток пирена достаточно сильно взаимодействует с одноцепочечной ДНК, поскольку взаимодействие с другим остатком пирена и образование эксимера блокируется. Кроме того, эти данные показывают, что пирен сильнее взаимодействует с одноцепочечной ДНК, чем с

дуплексной. Это интересный факт, поскольку основным способом взаимодействия пирена с ДНК считалась интеркаляция в дуплекс.

Для получения и исследования свойств 2- и 4-фенилэтинилпиренов были разработаны методы синтеза 2- и 4-этинилпиренов из пирена путём гидрирования и разделения продуктов **122** и **127** с последующим ацилированием, ароматизацией, превращением в хлоракролеины и фрагментацией последних по Бодендорфу (схема 7). Алкины **126** и **131** были использованы В.В. Филичевым для постсинтетической модификации ДНК: сначала в олигонуклеотиды вводили иодарильные псевдонуклеозиды **132** и **135**, а затем, перед деблокированием, проводили сочетание по Соногашире с алкинами. Таким образом получали ДНК, содержащие остатки 2- и 4-РЕРу **133**, **134**, **136**, **137**.



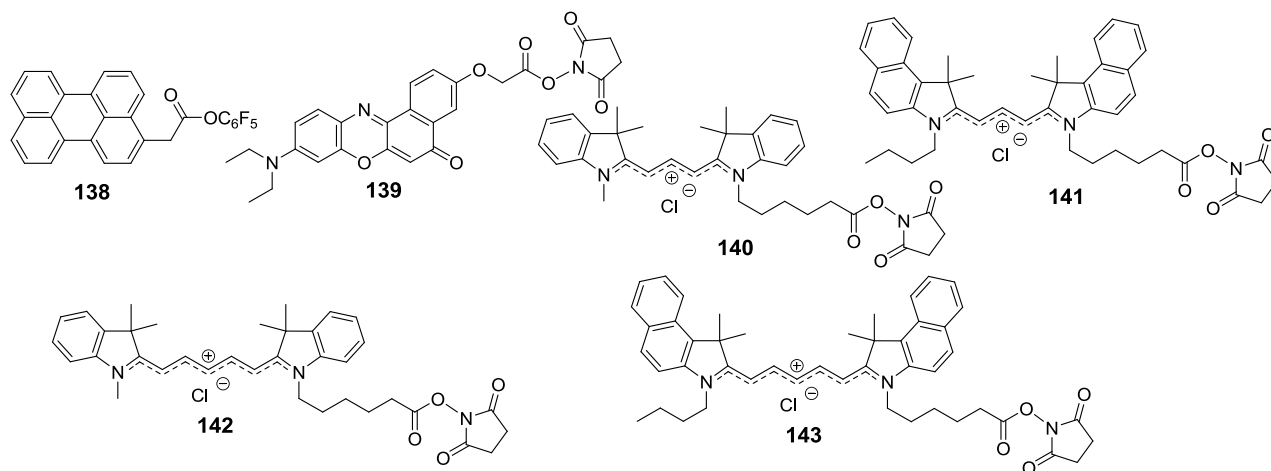
**Реагенты и условия:** *i*, H<sub>2</sub> (160 атм), 10% Pd/C, EtOAc, 60°C, 24 ч; *ii*, Ac<sub>2</sub>O, AlCl<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5°C; *iii*, DDQ, толуол, 110°C, 1 ч; *iv*, DMF, POCl<sub>3</sub>; *v*, KOH, диоксан, вода.

**Схема 7.**

### 1.2.2. Активированные эфиры красителей

Если модифицированный олигонуклеотид содержит алифатическую аминогруппу, то по ней в водном буфере легко проводится модификация активированными эфирами – другие функциональные группы нуклеиновой кислоты при этом не затрагиваются. Для модификации

олигонуклеотидов были синтезированы активированные эфиры карбоксипроизводных флуоресцентных красителей перилена **138**, нильского красного **139** и цианиновых красителей  $Cu_3$  (**140**),  $Cu_{3.5}$  (**141**),  $Cu_5$  (**142**),  $Cu_{5.5}$  (**143**).

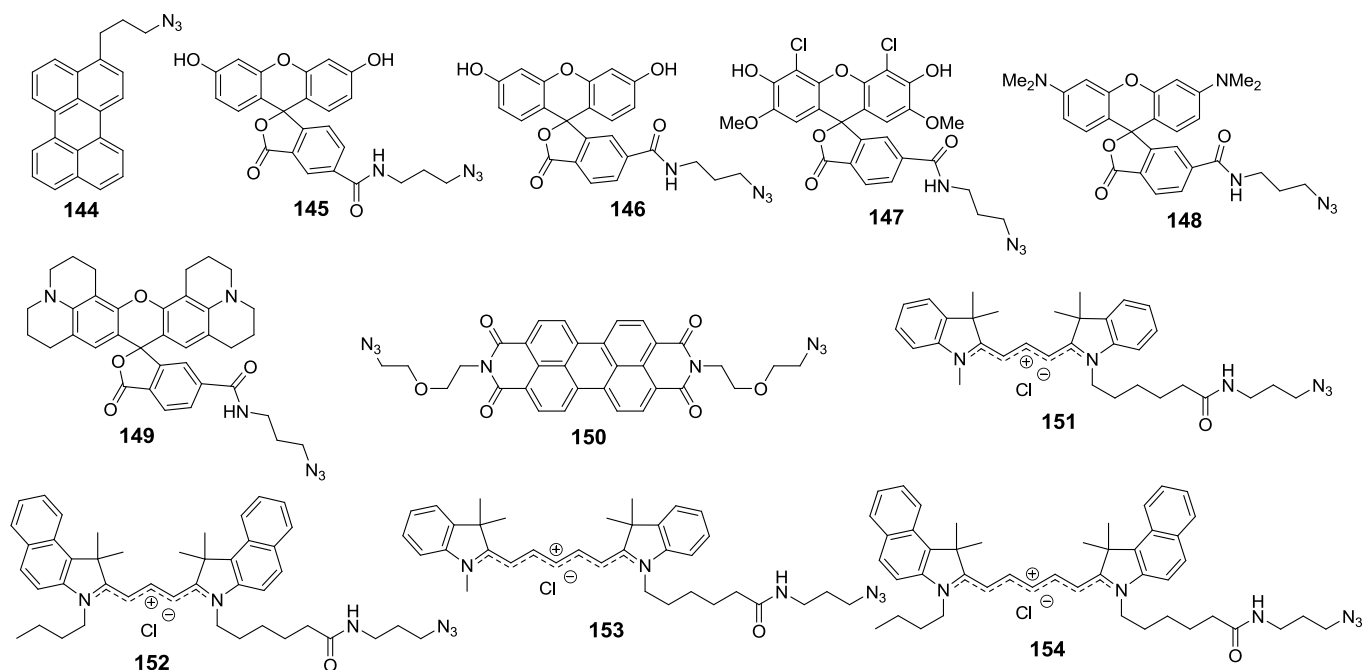


Активация карбоксильной группы достигается превращением карбоксильной группы в пентафторфениловый или оксисукцимидный эфир. Активированные эфиры можно использовать для мечения не только аминопроизводных НК, но и других биомолекул – например, белков и пептидов.

### 1.2.3. Азиды точек разветвления и красителей. Блоки для сборки ДНК-наноструктур

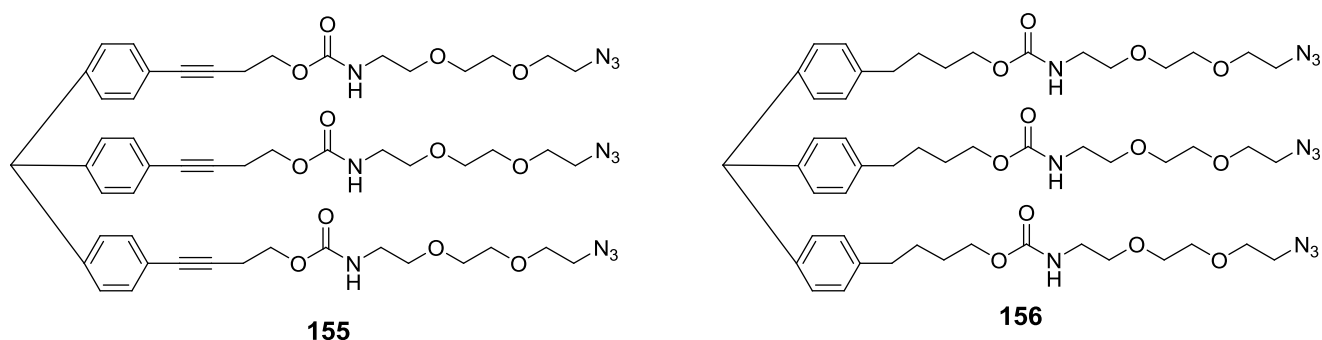
Со времени открытия в 2002 г. катализа соединениями меди (I) реакции циклоприсоединения азидов и алкинов она получила весьма широкое распространение как метод биоконъюгации. Развитие применения CuAAC (Copper-catalyzed azide alkyne cycloaddition) в приложении к нуклеиновым кислотам на некоторое время задержалось, поскольку соединения меди (I) в присутствии кислорода вызывают эффективное расщепление нуклеотидных последовательностей. Однако после введения в обиход хелатирующих лигандов для Cu(I) и ряда других методических усовершенствований реакция стала популярна и для синтеза олиго- и полинуклеотидных конъюгатов. CuAAC позволяет использовать только те функциональные группы, которые введены в заданные положения и не затрагивает остальную часть биомолекулы. Ортогональность CuAAC по отношению к подавляющему большинству других методов биоконъюгации расширяет возможности исследователя при синтезе сложных конъюгатов.

Для исследования модификации ДНК был синтезирован набор алифатических азидопроизводных флуоресцентных красителей – перилена (**144**), 5- и 6-карбоксифлуоресцеина (**145** и **146**), 6-карбокси-дихлордиметоксифлуоресцеина (JOE, **147**), 6-карбокси-тетраметилродамина (**148**), 6-карбокси-X-родамина (ROX, **149**), диимида перилен-3,4,9,10-тетракарбоновой кислоты (**150**), цианинов  $Cu_3$  (**151**),  $Cu_{3.5}$  (**152**),  $Cu_5$  (**153**),  $Cu_{5.5}$  (**154**). Были отработаны условия присоединения азидопроизводных к алкин-модифицированным олигонуклеотидами, полученными с помощью реагентов **15–20**.



Оказалось, что в присутствии лиганда ТВТА модификация ацетиленовых производных олигонуклеотидов протекает весьма эффективно и данный метод превосходит по выходам и чистоте конечного продукта другие методы конъюгации. Так, если для полной конверсии аминомодифицированного олигонуклеотида в реакции с активированным эфиром в водном буфере требуется примерно 20-кратный избыток активированного эфира, то для достижения полной конверсии алкинового олигонуклеотида необходимо лишь 1.5-кратное мольное количество азид красителя. Из соединения **150** были получены конъюгаты, содержащие 2 олигонуклеотидных остатка. Флуоресценция красителя **150**, ковалентно присоединённого к ДНК, потушена за счёт переноса электрона с ДНК на краситель.

Соединения, содержащие несколько азидогрупп, после присоединения по ним олигонуклеотидов дают полиолигонуклеотидные конъюгаты, которые могут служить мономерными блоками для сборки ДНК-наноструктур.



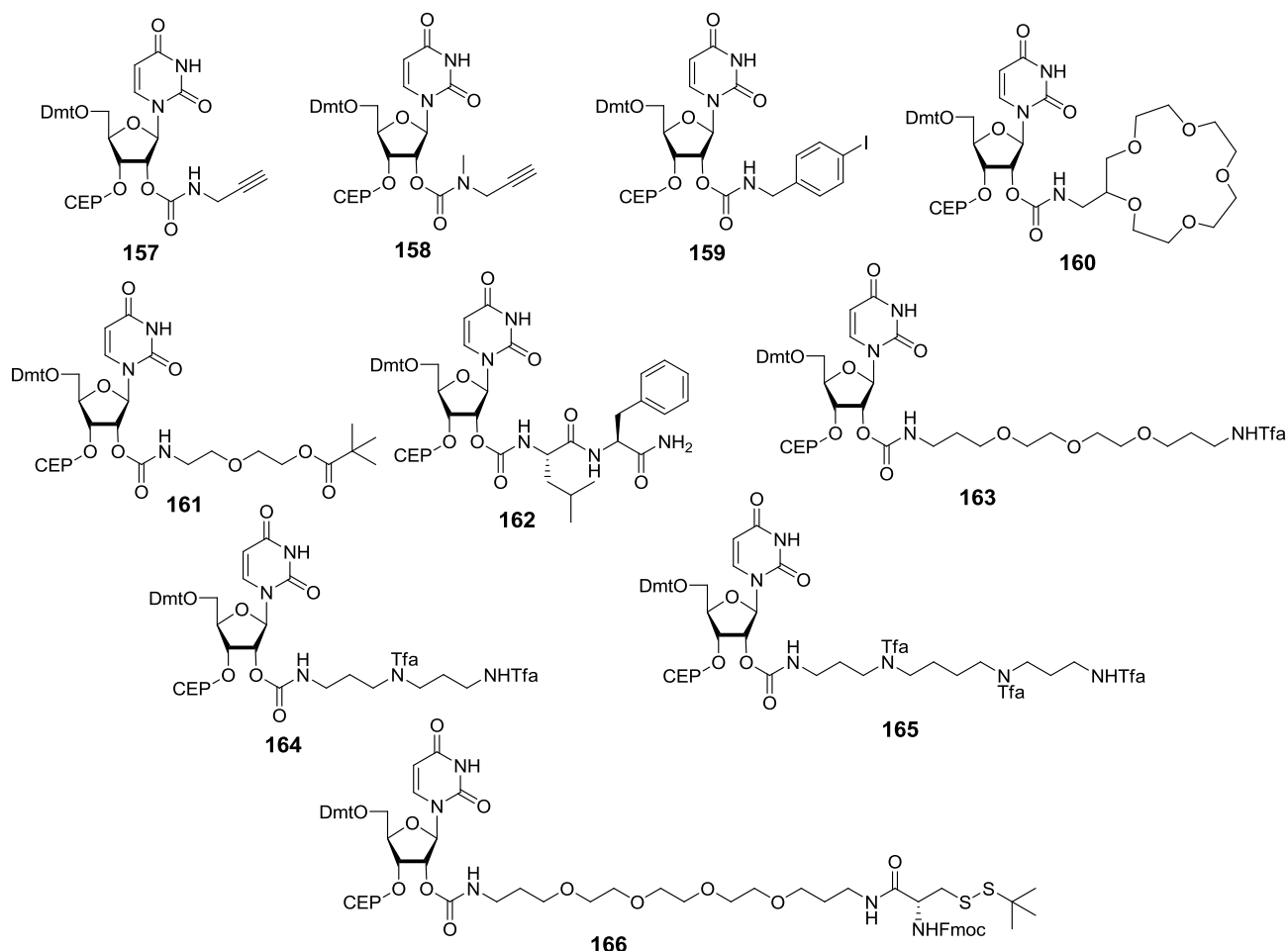
С целью получения таких блоков были синтезированы «точки разветвления» **155** и **156**, содержащие линкеры различной жёсткости. Эти соединения дают в CuAAC хороший выход триолигонуклеотидных конъюгатов, которые были использованы для сборки ДНК-наноструктур, как дискретных («наноацетилен»), так и полимерных («нанографит»).



## 2. Реагенты на основе пиримидиновых нуклеозидов, модифицированных по углеводной части

### 2.1. Уридин-2'-карбаматы для введения модификаций в малую бороздку ДНК. Увеличение интенсивности флуоресценции пирена при гибридизации с РНК

Известно, что присоединение модификаций по 2'-*O*-атому нуклеозидов позволяет адресовать модификации в малую бороздку ДНК-дуплекса. Был разработан способ введения модификаций по 2'-положению уридина с помощью карбаматного линкера и синтезирован набор амидофосфитных реагентов **157–166**. Эти реагенты позволяют вводить в олигонуклеотиды терминальные алкины (**157**, **158**), иодарен (**159**), краун-эфир (**160**), гидрофильный спирт (**161**), дипептид (**162**), амин на длинноцепочечном гидрофильном спейсере (**163**), диамин (**164**), триамин (**165**) и цистеин, пригодный для нативного лигирования с белками (**166**). Данные термической денатурации показывают, что карбаматная модификация дестабилизирует ДНК-дуплекс и поэтому на 15-звенный олигонуклеотид целесообразно вводить не более трёх модификаций.



Несмотря на приближенность 2'-карбамата к 3'-амидофосфиту и объёмность некоторых модификаций, реагенты хорошо конденсируются в синтезаторе и модифицированные олигонуклеотиды часто могут быть использованы без дополнительной очистки. На **рис. 6** показан масс-спектр неочищенного олигонуклеотида **167**, дважды модифицированного остатками краун-эфира. После синтеза олигонуклеотидов с аминогруппами можно проводить их дальнейшую

модификацию активированными эфирами. Например, после введения аминомодификации с помощью реагента **163** с последующим ацилированием эфиром **139** получен меченый нильским красным олигонуклеотид **168**. Флуоресценция красителя в конъюгате с олигонуклеотидом потушена. Но краситель способен взаимодействовать с двухцепочечной ДНК: он нивелирует карбаматную дестабилизацию дуплекса.

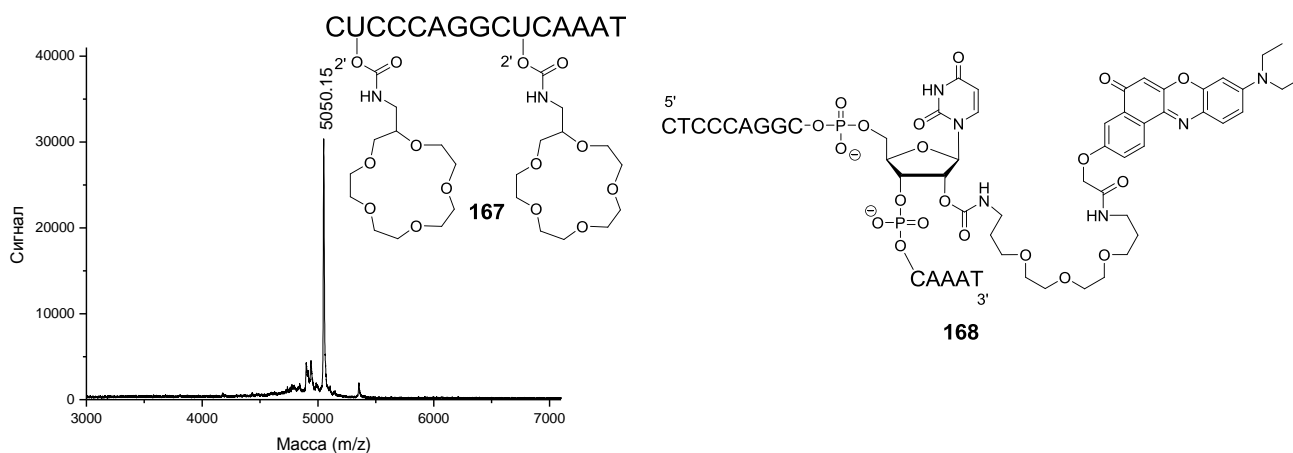
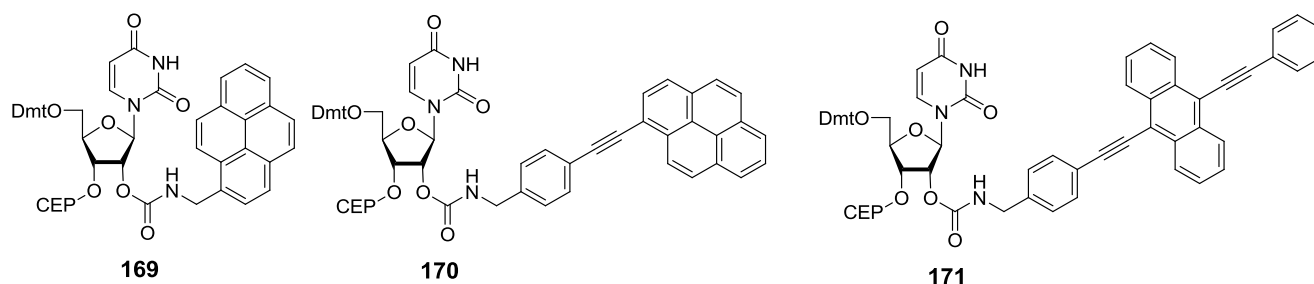


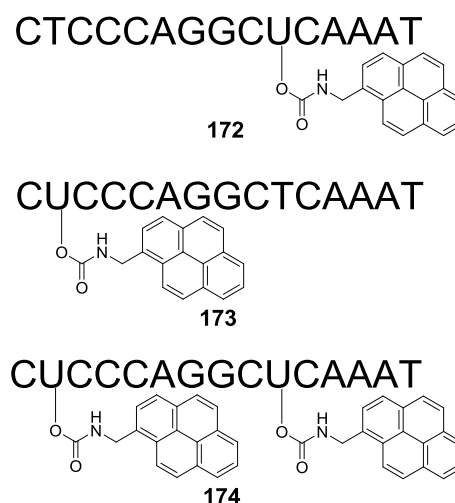
Рис. 6. MALDI масс-спектр сырого конъюгата **167**.

Через 2'-карбамат вводились метки, устойчивые к реагентам и условиям синтетического цикла в синтезаторе, например, флуоресцентные производные пирена, 1-PEPY и ВРЕА **169–171**.



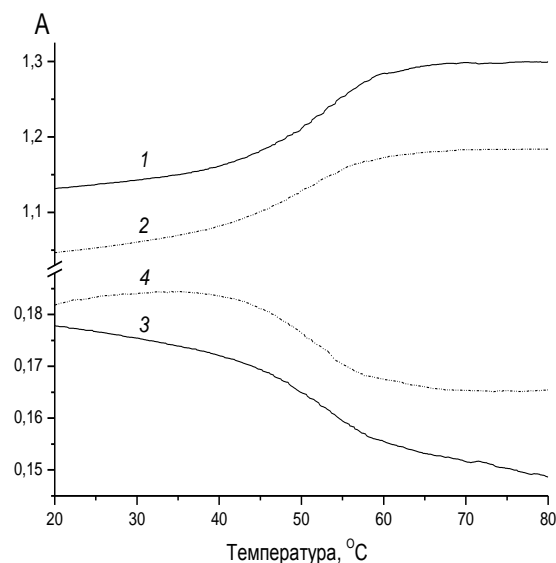
С помощью реагентов **170** и **171** в олигонуклеотиды вводили красители, составляющие донорно-акцепторную пару. Пиреновый реагент **169** позволяет модифицировать олигонуклеотиды пиреном в малую бороздку. Этот нуклеозид обладает интересными свойствами: пиреновый остаток полностью компенсирует карбаматную дестабилизацию. Более того, если в дуплексе напротив нуклеотида **169** находится однонуклеотидная замена (С, G или T вместо А), то мисматчевая дестабилизация дуплекса оказывается незначительной. Это позволяет предположить, что при отсутствии комплементарности роль пары оснований выполняет плоский пиреновый полицикл, который оказывает стабилизирующее действие на дуплекс благодаря стэкинг-взаимодействиям («укладыванию в стопку» плоских молекул).

Интересные спектральные свойства пиреновых



карбаматов можно рассмотреть на примере олигонуклеотидов **172–174**. При гибридизации с комплементарной ДНК интенсивность флуоресценции пиреновой метки практически не меняется. Но при гибридизации с комплементарной РНК флуоресценция конъюгата **172** возрастает в 6 раз, конъюгата **173** – в 30 раз, дважды меченого конъюгата **174** – в 13 раз. Эти результаты свидетельствуют о том, что в ДНК-дуплексе пирен более подвержен тушению основаниями, и в более прочном дуплексе с РНК он по-видимому в значительно большей степени экспонирован в окружающую среду.

Интересно, что плавление дуплексов олигонуклеотида **174** с ДНК и РНК можно детектировать не только по нуклеотидному поглощению при 260 нм, но и по пиреновому поглощению при 349 нм. При диссоциации дуплекса нуклеотидное поглощение возрастает, пиреновое же – наоборот, уменьшается, но все кривые имеют сигмоидный вид и температуры плавления, измеренные как точки перегиба кривых, совпадают (рис. 7).

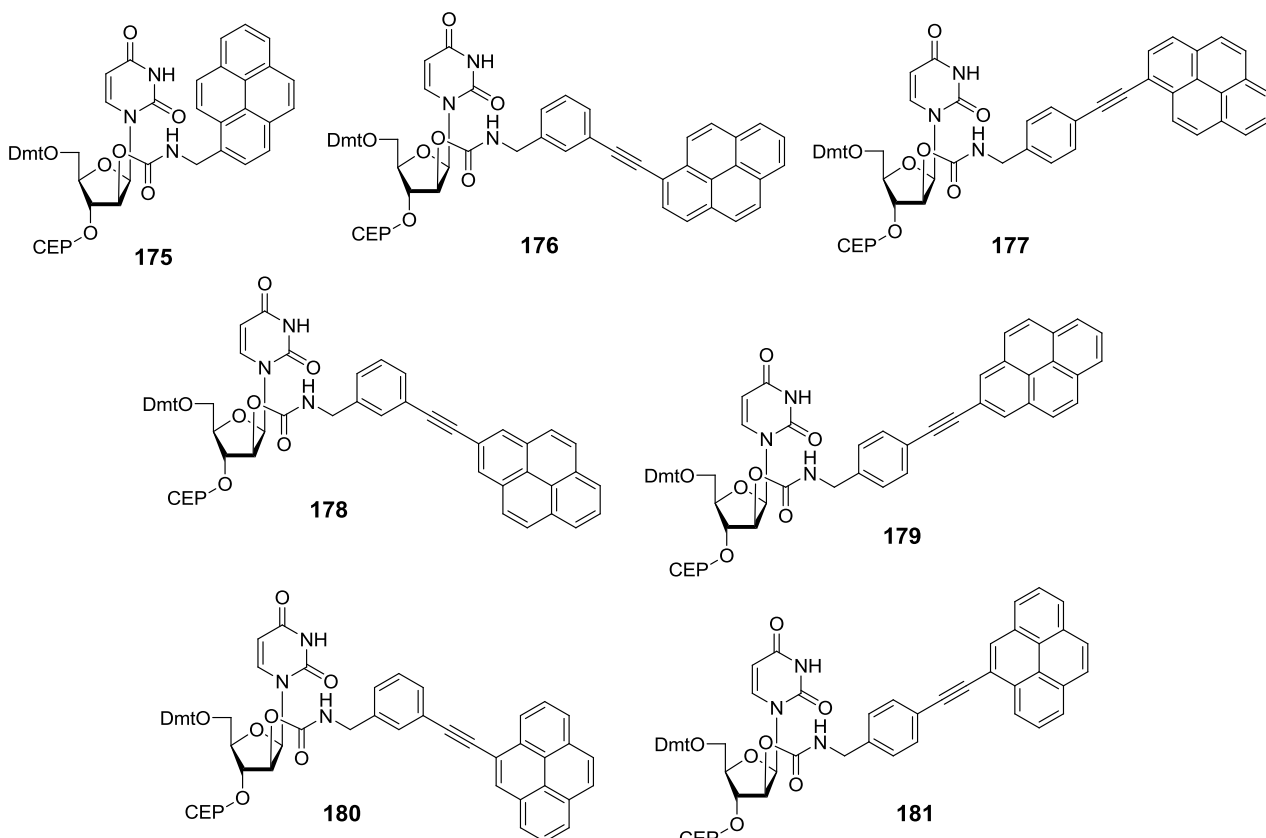


**Рис. 7.** Кривые термической денатурации дуплексов **174×ДНК** (1,3) и **174×РНК** (2,4) в гибридном буфере, детектируемые по поглощению при 260 (1,2) и 349 нм (3,4).

## 2.2. Арабино-уридин-2'-карбаматы. Эксимеры пирена и фенилэтинилпиренов в большой бороздке ДНК

Удобство введения модификаций в олигонуклеотиды с помощью уридин-2'-карбаматов явилось побудительным мотивом для синтеза аналогичных соединений на основе арабино-нуклеозида. В отличие от *рибо*-производных, присоединение по 2'-О-атому арабино-нуклеозидов направляет модификацию в большую бороздку ДНК-дуплекса. Сначала был синтезирован пиреновый реагент **175**. Оказалось, что денатурация комплементарного комплекса олигонуклеотида, содержащего два нуклеозида **175**, и аналогичного олигонуклеотиду **174** также может быть зарегистрирована по пиреновому поглощению.

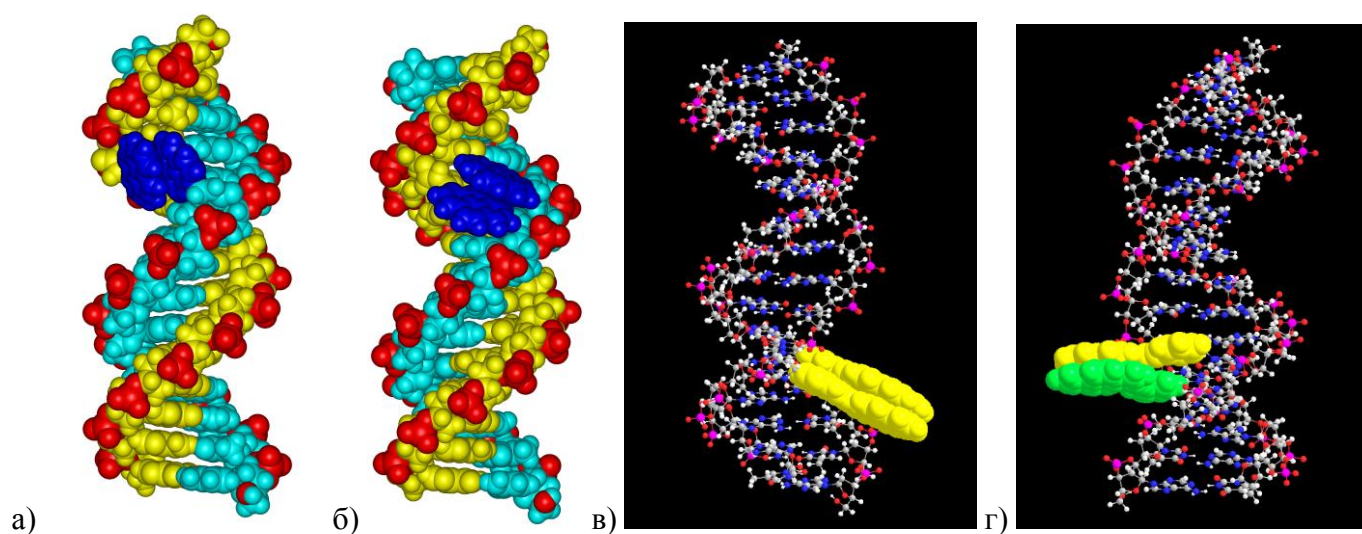
Подтверждением того, что арабино-карбаматная модификация направляет заместитель в большую бороздку, явилась регистрация флуоресценции межцепочечного эксимера, который мог образоваться в результате димеризации пиреновых остатков лишь в большой бороздке. Эксимер регистрируется только в том случае, когда модифицированные нуклеозиды разделены одной парой оснований (дуплекс **182**). При увеличении расстояния эксимерная флуоресценция пропадает (дуплексы **183**, **184**) (табл. 6).



**Таблица 6.** Флуоресценция 15-звенных дуплексов, содержащих пиреновые (из реагента **175**) и 1-PEPy-арабино-карбаты: *мета*-присоединённый 1-PEPy из реагента **176**; и *пара*-присоединённый 1-PEPy из реагента **177**.

Дуплекс	Расположение остатков красителя	Эксимер	Дуплекс	Расположение остатков красителя	Эксимер
<b>182</b>	$\begin{array}{c} 5' \\ \text{---N-175-N-N-N-N-N-N---} \\ 3' \\ \text{---N-N-N-N-N-175-N-N-N---} \\ 5' \end{array}$	+	<b>184</b>	$\begin{array}{c} 5' \\ \text{---N-175-N-N-N-N-N-N---} \\ 3' \\ \text{---N-N-N-N-N-N-175-N---} \\ 5' \end{array}$	-
<b>183</b>	$\begin{array}{c} 5' \\ \text{---N-175-N-N-N-N-N-N---} \\ 3' \\ \text{---N-N-N-N-N-175-N-N-N---} \\ 5' \end{array}$	-			
<b>185</b>	$\begin{array}{c} 5' \\ \text{---N-176-N-N-N-N-N-N---} \\ 3' \\ \text{---N-N-N-N-176-N-N-N---} \\ 5' \end{array}$	+/-	<b>191</b>	$\begin{array}{c} 5' \\ \text{---N-177-N-N-N-N-N-N---} \\ 3' \\ \text{---N-N-N-N-177-N-N-N---} \\ 5' \end{array}$	+
<b>186</b>	$\begin{array}{c} 5' \\ \text{---N-176-N-N-N-N-N-N---} \\ 3' \\ \text{---N-N-N-N-N-176-N-N-N---} \\ 5' \end{array}$	+/-	<b>192</b>	$\begin{array}{c} 5' \\ \text{---N-177-N-N-N-N-N-N---} \\ 3' \\ \text{---N-N-N-N-N-177-N-N-N---} \\ 5' \end{array}$	+
<b>187</b>	$\begin{array}{c} 5' \\ \text{---N-176-N-N-N-N-N-N---} \\ 3' \\ \text{---N-N-N-N-N-176-N-N-N---} \\ 5' \end{array}$	-	<b>193</b>	$\begin{array}{c} 5' \\ \text{---N-177-N-N-N-N-N-N---} \\ 3' \\ \text{---N-N-N-N-N-177-N-N-N---} \\ 5' \end{array}$	+/-
<b>188</b>	$\begin{array}{c} 5' \\ \text{---N-176-N-N-N-N-N-N---} \\ 3' \\ \text{---N-N-N-N-177-N-N-N---} \\ 5' \end{array}$	+	<b>194</b>	$\begin{array}{c} 5' \\ \text{---N-177-N-N-N-N-N-N---} \\ 3' \\ \text{---N-N-N-N-176-N-N-N---} \\ 5' \end{array}$	+
<b>189</b>	$\begin{array}{c} 5' \\ \text{---N-176-N-N-N-N-N-N---} \\ 3' \\ \text{---N-N-N-N-N-177-N-N-N---} \\ 5' \end{array}$	+/-	<b>195</b>	$\begin{array}{c} 5' \\ \text{---N-177-N-N-N-N-N-N---} \\ 3' \\ \text{---N-N-N-N-N-176-N-N-N---} \\ 5' \end{array}$	+
<b>190</b>	$\begin{array}{c} 5' \\ \text{---N-176-N-N-N-N-N-N---} \\ 3' \\ \text{---N-N-N-N-N-177-N-N-N---} \\ 5' \end{array}$	-	<b>196</b>	$\begin{array}{c} 5' \\ \text{---N-177-N-N-N-N-N-N---} \\ 3' \\ \text{---N-N-N-N-N-176-N-N-N---} \\ 5' \end{array}$	+/-

После установления этой закономерности для пирена представляло интерес проверить, как поведут себя более объёмные фенилэтинипириновые флуорофоры. Были синтезированы *арабино*-карбаматные производные всех трёх возможных фенилэтинилпиренов (1-, 2- и 4-); кроме того, каждый краситель присоединялся метиленовым линкером к карбамату по *мета*- или *пара*-положению фенильного кольца (реагенты **176–181**). В **табл. 6** приведены данные для всех возможных сочетаний *мета*- и *пара*-производных 1-PEPy (дуплексы **185–196**). Данные показывают, что способность к образованию эксимера зависит от способа присоединения флуорофора. Нуклеозид **177** обладает большей склонностью к образованию эксимеров и для него наблюдается отчётливый эксимер даже в случае разделения красителей двумя парами оснований (дуплексы **192** и **195**). Молекулярные модели эксимерных дуплексов показаны на **рис. 8**.



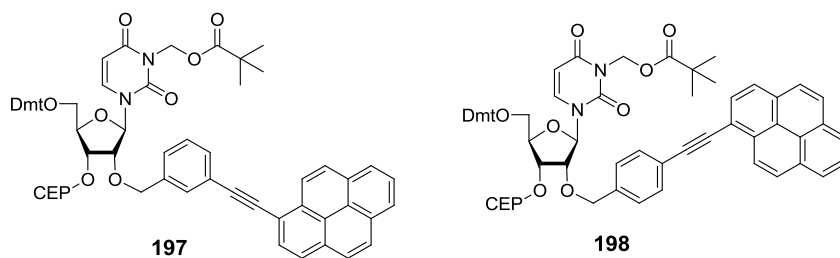
**Рис. 8.** Молекулярные модели эксимеров в большой бороздке: а), б) – дуплекс **181** (различные варианты расположения пиреновых остатков); в) – дуплекс **191**; г) – дуплекс **194** (остатки PEPy выделены).

Моделирование показывает, что если пиреновый димер способен поместиться в большой бороздке (**рис. 8а,б**), то 1-PEPy-пара в значительной степени экспонирована в растворитель (**рис. 8в,г**). Дальнейшее изучение других изомеров фенилэтинилпирена – 2-PEPy (реагенты **178, 179**) и 4-PEPy (реагенты **180, 181**) показало, что 2-PEPy вообще неспособен к образованию эксимеров, 4-PEPy может образовывать эксимеры (в том числе смешанные эксимеры с 1-PEPy. Однако эффективность образования эксимеров из пары 1-PEPy наибольшая.

### 2.3. Эксимеробразующие зонды на основе 2'-O-(1-PEPy)метилпроизводных уридина

Поскольку эксимеробразующие зонды **82** и **83** на основе нуклеозидных 1-PEPy-реагентов оказались пригодными для детекции однонуклеотидных замен, представляло интерес воспроизвести эти зонды на основе нуклеозидов. Для этого были синтезированы реагенты **197** и **198**, в которых 1-PEPy (*мета*- и *пара*-) присоединён к 2'-O-атому уридина с помощью метиленового линкера. Был синтезирован весь набор аналогов зондов **82** и **83**, в которых фенилэтинилпиреновый бифлуорофор составлялся комбинацией реагентов **197** и **198**, всего 8

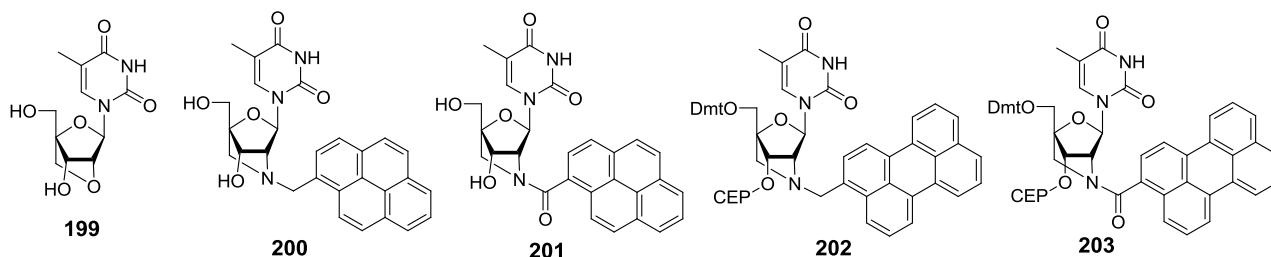
зондов (каждый в комбинации 5'-197-197-3', 5'-197-198-3', 5'-198-197-3' и 5'-198-198-3'). Оказалось, что для каждого зонда соотношение эксимерной и мономерной флуоресценции после гибридизации с модельными мутантными и дикими последовательностями характерно и может быть использовано для определения типа однонуклеотидной замены. К сожалению, метод не может быть использован, если в образце присутствуют одновременно два или больше типов последовательностей. Гибридизация зондов с комплементарной РНК не приводила к ощутимому изменению флуоресценции.



Для исследования детекции мутаций на РНК был синтезирован такой же набор из 8 зондов, в котором 2'-дезоксинуклеотиды были заменены на 2'-ОМе-нуклеотиды. Флуоресценция всех зондов была эксимерной. Интересные свойства при гибридизации с РНК продемонстрировали два зонда, аналоги зонда **83**. Интенсивность флуоресценции зонда 5'-197-198-3' при гибридизации с комплементарной РНК снижалась на 40%, а при гибридизации с любым из трёх типов мутантной РНК – в 6 раз. Поведение зонда 5'-198-197-3' было похожем лишь в части взаимодействия с комплементарной РНК – интенсивность эмиссии снижалась вдвое. Но гибридизация с любой из трёх мутантных РНК приводила к росту интенсивности в 4 раза. Таким образом, зонды 5'-197-198-3' и 5'-198-197-3' демонстрируют отчётливый, хотя и противоположный, отклик на гибридизацию с мутантной РНК. Интересно, что зонды, содержавшие два одинаковых нуклеозида (5'-197-197-3' и 5'-198-198-3'), не позволяют различить комплементарную и мутантную РНК-последовательность.

#### 2.4. Зонды на основе 3-периленоильного производного 2'-амино-LNA; возрастание эмиссии при гибридизации. PEPy на 2'-амино-LNA

Известно, что включение в ДНК-олигомеры так называемых LNA-нуклеозидов типа **199** приводит к резкому росту стабильности комплементарных комплексов. Ранее изучались и показали интересные флуоресцентные свойства в составе олигомеров пиреновые производные 2'-амино-LNA **200** и **201**. Мы синтезировали соответствующие периленовые аналоги, которые вводились в олигомеры с помощью амидофосфитных реагентов **202** и **203**.



Как и следовало ожидать, в ДНК-дуплексах нуклеозид из реагента **202** является акцептором энергии флуоресценции нуклеозида **200**. Было показано, что эффективность переноса энергии коррелирует с расстоянием между пиреновым и периленовым нуклеозидом; она составляет лишь 10%, если красители разделены десятью парами оснований и достигает 90% при их соседнем расположении.

Ранее было обнаружено, что квантовый выход флуоресценции нуклеозида **201** в комплементарных комплексах резко возрастает. Поскольку эмиссия перилена сдвинута в видимую область по сравнению с эмиссией пирена, с помощью реагента **203** были получены олигомеры, содержащие один, два или три периленоильных нуклеотида.

Модифицированный нуклеозид оказывал стабилизирующее действие на НК-дуплекс. Особенно велик был эффект для олигонуклеотида, в котором два модифицированных остатка были разделены одним природным нуклеотидом. Температура плавления его комплекса с ДНК была на 7.8°C, а с РНК на 15.5°C выше соответствующих температур плавления немодифицированного дуплекса. Зонды на основе периленоильного нуклеотида продемонстрировали отличную дискриминацию однонуклеотидных замен – в случае мисматча напротив модифицированного или соседнего нуклеотида уменьшение температуры плавления дуплексов часто составляло 20°C и более, а в отдельных случаях – 33–34°C. Этот результат весьма ценен, поскольку он означает, что подобные зонды при физиологических температурах (+25 – +40°C) способны гибридизоваться только с комплементарными последовательностями, что важно для экспериментов *in vivo*.

Эмиссия периленоильного нуклеозида **203** как одиночной метки мало изменяется при гибридизации с комплементарной ДНК и РНК. Но для зондов, содержащих два или три периленоильных нуклеотида, где эмиссия флуорофоров потушена друг другом, гибридизация с ДНК и РНК приводит к упорядоченному расположению флуорофоров в пространстве и интенсивность эмиссии возрастает. Однако при наличии в НК-матрице однонуклеотидной замены возрастания эмиссии зонда практически не наблюдается. Например, флуоресценция зонда 5'-G-**203**-GA-**203**-A-**203**-TGC (**204**) увеличивается в 8 раз при гибридизации только с

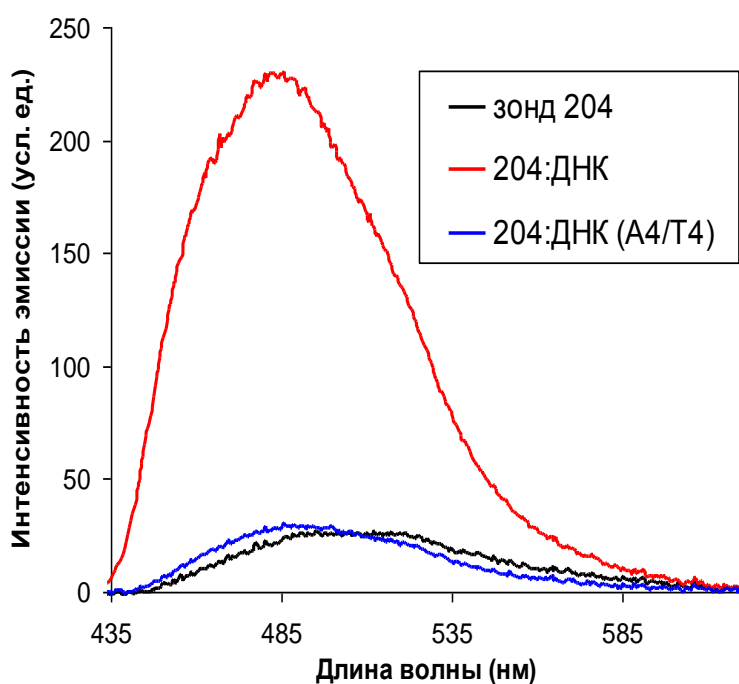
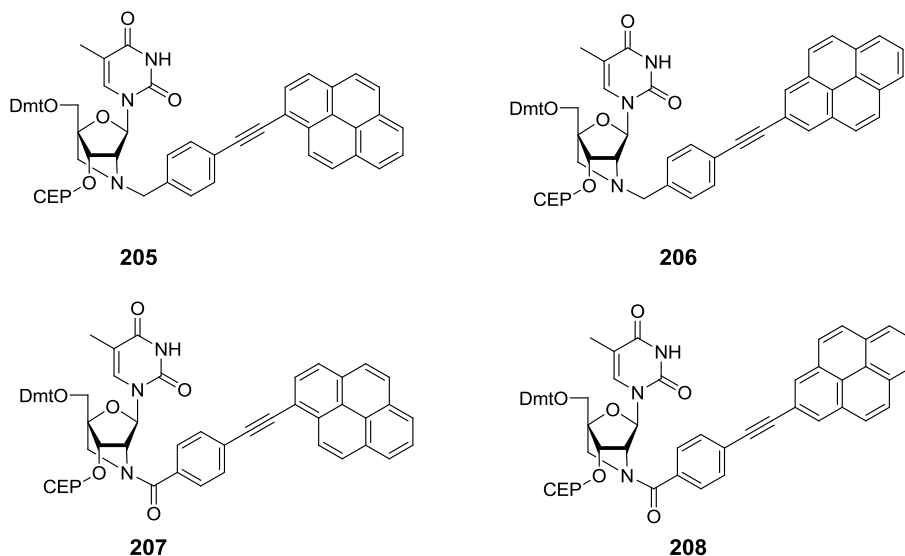


Рис. 9. Флуоресценция зонда **204** и его дуплексов с комплементарной и мутантной ДНК.

комплементарной последовательностью (рис. 9). Такой уровень дискриминации мутаций соответствует лучшим образцам флуоресцентных гомогенных сенсоров.

Также были синтезированы амидофосфиты на основе N-модифицированных 2'-амино-LNA-нуклеозидов **205–208**, которые содержат способный к образованию эксимеров 1-PEPy и неспособный к образованию эксимеров 2-PEPy, присоединённые по положению 4 фенильного кольца с помощью метиленового или карбонильного линкера.

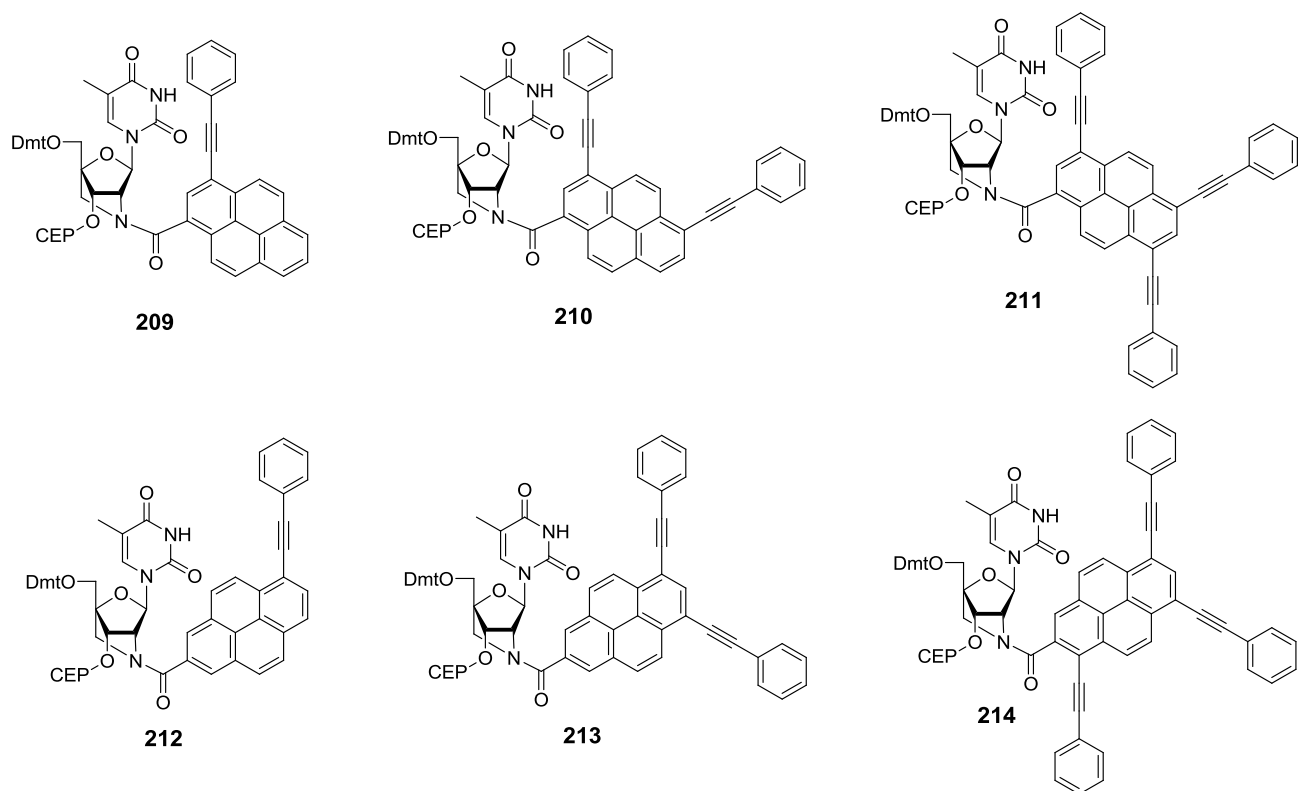


Из этих реагентов были получены модифицированные олигонуклеотиды, для которых изучались гибридизационные и флуоресцентные свойства.

## 2.5. Бис- и трис(фенилэтинил)пиреноильные производные 2'-амино-LNA. Флуоресценция межцепочечных эксимеров

Присоединение ПАУ (пирена, перилена) к N-атому 2'-амино-LNA-нуклеозидов с помощью карбонильной группы структурно благоприятно с точки зрения полезных эффектов в изменении флуоресценции при гибридизации (нуклеозиды **201** и **203**). С другой стороны, известно, что флуоресцентные свойства ПАУ можно изменять введением одного или нескольких фенилэтинильных заместителей. Поскольку пирен легче поддаётся функционализации, были синтезированы аналоги нуклеозида **201**, содержащие одну, две и три фенилэтинильных группы. Синтез соответствующих кислот включал ступенчатое бромирование 1- и 2-ацетилпирена, замещение атомов брома фенилэтинильными группами в условиях реакции Соногаширы и последующее окисление ацетильной группы до карбоксильной. Положение фенилэтинильных заместителей в пиреновом остатке устанавливали с помощью  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ -корреляционной спектроскопии. После ацилирования полученными моно-, бис- и трис(фенилэтинил)пиренкарбоновыми кислотами 2'-O-Dmt-2'-амино-LNA-нуклеозидов и 3'-O-фосфитилирования получены амидофосфитные реагенты **209–214**. Хотя они несут весьма объёмные заместители вблизи амидофосфитной функции, их конденсация на растущую олигонуклеотидную цепь может быть легко выполнена в ручном режиме ( $2 \times 30$  мин).





Был синтезирован ряд олигонуклеотидных конъюгатов, содержащих нуклеозиды **209–214**, и изучена термическая стабильность их дуплексов с ДНК и РНК. Кривые плавления всех модифицированных дуплексов, за исключением полученных из реагентов **211** и **214**, являются сигмоидальными и монофазовыми, их вид не отличается от вида кривых плавления немодифицированных аналогов. Дважды меченые дуплексы проявили термическую стабильность намного выше, чем моно-меченные. Это указывает на кооперативный характер взаимодействия между остатками ПАУ с точки зрения стабилизации дуплексов.

Максимумы поглощения и флуоресценции для поли(фенилэтинил)пиреновых производных существенно bathochromно сдвинуты по сравнению с пиреном. Это можно продемонстрировать в ряду конъюгатов 5'-GTGA-**209**-ATGC (**215**), 5'-GTGA-**212**-ATGC (**216**), 5'-GTGA-**210**-ATGC (**217**), 5'-GTGA-**213**-ATGC (**218**), 5'-GTGA-**211**-ATGC (**219**), 5'-GTGA-**214**-ATGC (**220**) (рис. 10).

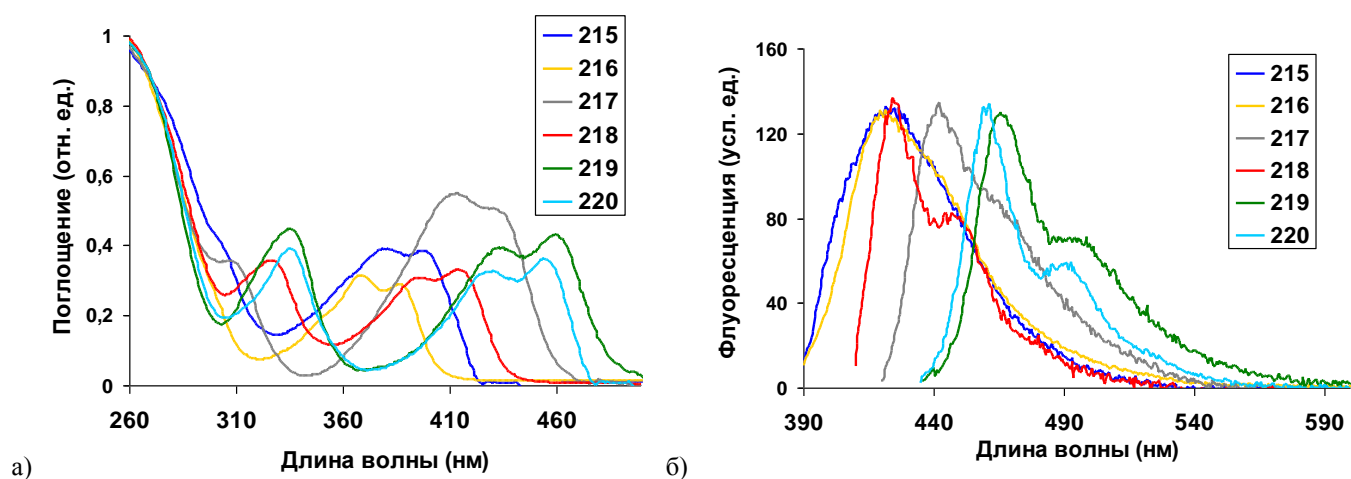
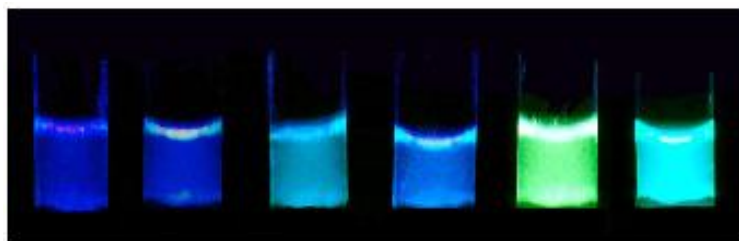


Рис. 10. Поглощение (а) и флуоресценция (б) олигонуклеотидов, полученных из реагентов **209–214**.

Расширение системы  $\pi$ -сопряжения пирена не только привело к длинноволновым сдвигам максимумов поглощения и флуоресценции, но и увеличило квантовые выходы флуоресценции флуорофоров и значительно улучшило их способность к образованию внутри- и межцепочечных эксимеров. Например, нуклеозид **213** демонстрирует выраженную эксимерную эмиссию при 520 нм в случае соседнего расположения двух красителя в различных нуклеотидных цепях. Из описанных модификаций были синтезированы многочисленные эксимеробразующие зонды для детекции гибридизации НК. Но и одиночная метка представляет интерес. При гибридизации конъюгата **218** с комплементарными ДНК и РНК интенсивность эмиссии при 415 нм возрастала в 3 и 4 раза, соответственно. Квантовые выходы флуоресценции соответствующих дуплексов при этом достигали крайне высоких значений для пирена на НК ( $\Phi_f = 1.00$  и  $0.75$  для **218**:ДНК и **218**:РНК соответственно). Кроме того, олигонуклеотид **218** проявил высокую селективность дискриминации однонуклеотидных замен в отношении комплементарных ДНК и РНК. Конъюгат **218** не образовывал дуплексов при температуре выше  $10^\circ\text{C}$  со всеми мишенями, содержащими мисматчи, за исключением ДНК, содержащей некомплементарные нуклеотиды в положении 6. Спектральные свойства этих дуплексов позволяют предположить, что бис-PEPус интеркалирует в двойную спираль в том случае, когда напротив модификации расположен неспаренный нуклеотид, так как интенсивность флуоресценции конъюгата **218** совершенно не зависит от природы мисматча. Таким образом, совокупность привлекательных гибридизационных и спектральных свойств делает модифицированные нуклеозиды **209–214** полезными структурными блоками для дизайна различных флуоресцентных зондов, в том числе и основанных на флуоресценции эксимера. Эмиссия меток **209–214** хорошо видна невооружённым глазом (рис. 11), а длинноволновая флуоресценция эксимеров ещё более заметна.



**Рис. 11.** Фотография флуоресценции водных  $2 \times 10^{-6}$  М растворов конъюгатов (слева направо) **215**, **216**, **217**, **218**, **219** и **220**. Возбуждение светом лабораторной УФ-лампы ( $\lambda_{\text{max}} 365$  нм).

### 3. Реагенты на основе нуклеозидов, модифицированных по основанию

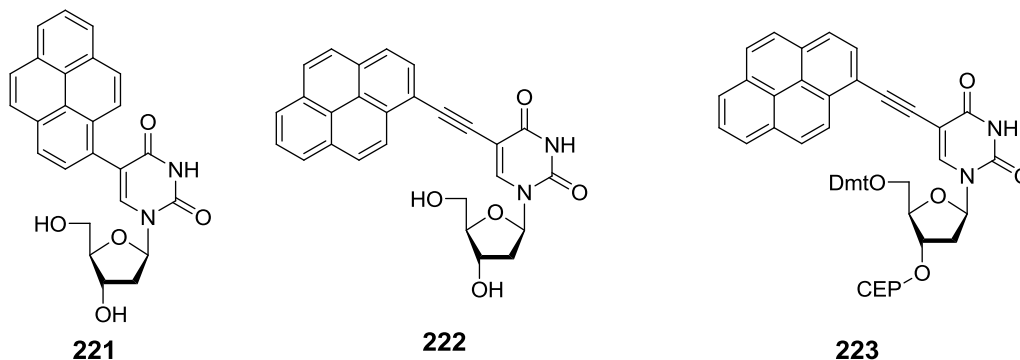
#### 3.1. 5-Алкильные производные пиримидиновых нуклеозидов. Сопряжение флуорофора с нуклеиновым основанием и возрастание эмиссии при гибридизации.

Гетероциклические основания нуклеиновых кислот непосредственно участвуют в процессе гибридизации, образуя друг с другом водородные связи. Комплементарные пары оснований укладываются в стопку внутри НК-дуплекса, который опоясывает снаружи сахарофосфатный скелет. На первый взгляд, модификация оснований должна вызывать наибольшую

дестабилизацию дуплекса, и поэтому метки лучше присоединять к сахарам или фосфатам. Но на практике только некоторые способы введения меток по сахару (например, функционализация 2'-амино-LNA) не вызывают дестабилизации дуплексов. И наоборот, введение модификаций в основание – по 5-положению пиримидиновых нуклеозидов с помощью жёсткого в месте присоединения к основанию линкера (алкинильного или алкенильного) представляет собой простой и хорошо разработанный метод присоединения метки внутри олигонуклеотида с гарантированной минимальной дестабилизацией.

Флуоресцентные красители обычно представляют собой полициклические ароматические или гетероциклические соединения. Их функционализация с помощью алкильных линкеров весьма незначительно влияет на спектральные свойства. Присоединение тройной связи увеличивает систему  $\pi$ -сопряжения и спектральные свойства красителя изменяются – максимумы возбуждения и эмиссии сдвигаются в длинноволновую область. Если к флуорофору присоединить арилэтинильную группу, то сдвиг спектров будет еще более заметным. Причиной этого явления также является увеличение системы  $\pi$ -сопряжения: тройная связь эффективно объединяет  $\pi$ -электронные системы двух ароматических или гетероароматических соединений. Определение термина “сопряжение” может быть предметом дискуссии, но, поскольку спектры поглощения и испускания существенно отличаются от спектров исходного красителя, можно сказать, что они принадлежат новому хромофору и флуорофору. Это значит, что арилэтинил-замещенный краситель представляет собой единое целое как хромофор и флуорофор. Новая молекула способна поглощать и испускать фотоны с меньшей энергией, что свидетельствует об изменении диапазона электронных переходов, а, следовательно, о расширении системы делокализации  $\pi$ -электронов.

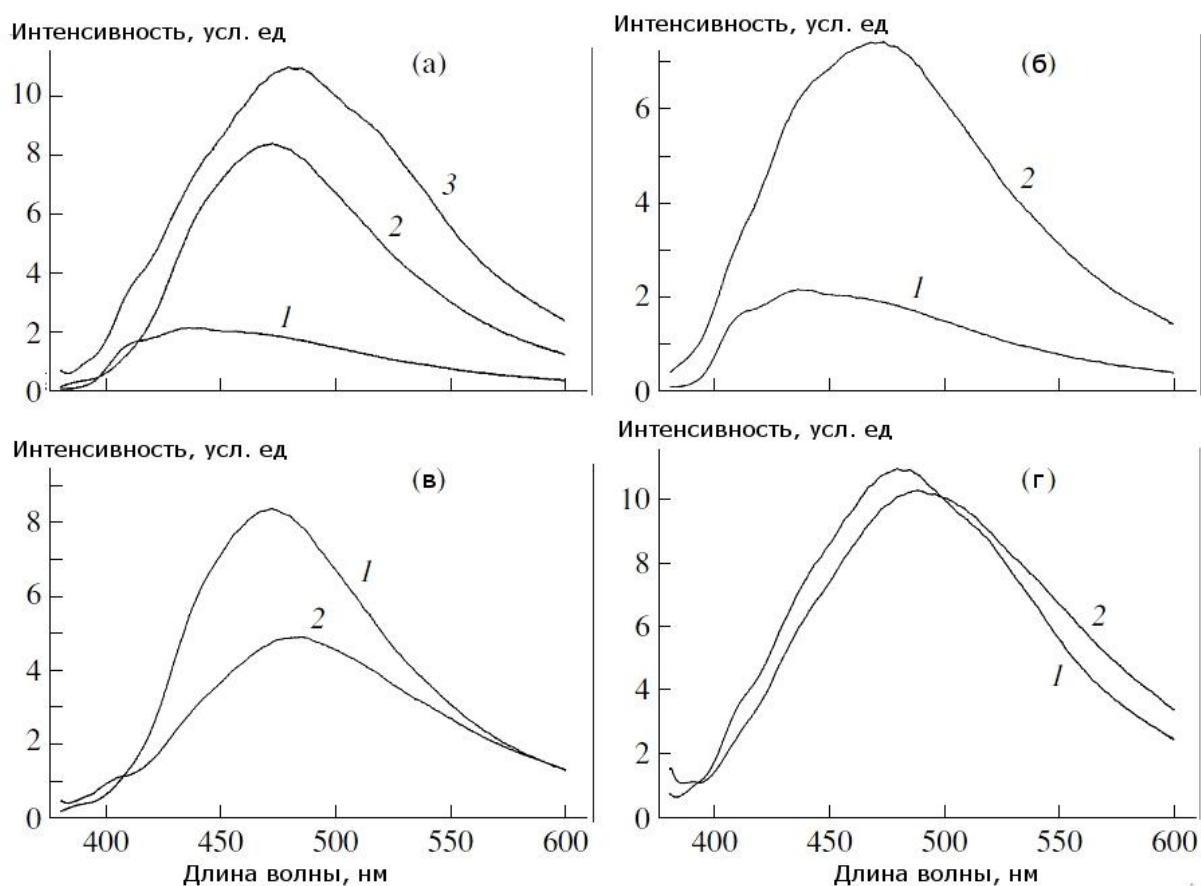
Нуклеиновые основания представляют собой плоские ненасыщенные гетероциклические соединения и отчасти имеют ароматический характер. Поэтому присоединение нуклеинового основания к флуорофору с помощью этинильного линкера должно существенно изменять спектральные свойства флуорофора.



Интересно, что для 5-(пирен-1-ил)-2'-дезоксисуридина **221**, который хорошо изучен сам по себе, так и в составе олигонуклеотидов, не наблюдается сопряжения пиренового остатка и урацила. Это следует из вида спектров поглощения и флуоресценции. Действительно, в молекуле **221** плоскости урацильного и пиренового фрагментов из-за отталкивания атомов водорода должны

быть повернуты друг к другу под углом примерно  $90^\circ$ , что делает невозможной делокализацию  $\pi$ -электронов. Таким образом, этилильная группа  $—C\equiv C—$  может служить уникальным линкером, обеспечивающим сопряжение двух фрагментов и объединяющим их в один хромофор (и флуорофор).

Нами синтезирован 5-(пирен-1-илэтинил)-2'-дезоксиридин **222**, первый нуклеозид, в котором флуорофор сопряжён с основанием с помощью тройной связи. Его длинноволновый максимум поглощения сдвинут на 60 нм в красную область по сравнению с пиреном (395 нм против 335 нм), а коротковолновый максимум флуоресценции – на 30 нм (400 нм против 370 нм у пирена). На основе нуклеозида **222** получен амидофосфитный реагент **223** и использован для синтеза модифицированных олигонуклеотидов, в том числе содержащих два и три модифицированных нуклеозида подряд. Кластерное расположение гидрофобных модификаций резко увеличивает время удерживания конъюгата на колонке в обращённо-фазовой ВЭЖХ. Например, для олигонуклеотидов 5'-ТТАСГСТТ-**223**-ССТСГТ (**224**), 5'-ТТАСГСТ-**223**-**223**-ССТСГТ (**225**) и 5'-ТТАСГС-**223**-**223**-**223**-ССТСГТ (**226**) время удерживания составляет 16.0, 20.6 и 27.6 мин соответственно. В результате присоединения к олигонуклеотиду длинноволновый максимум поглощения хромофора смещается до 400 нм.

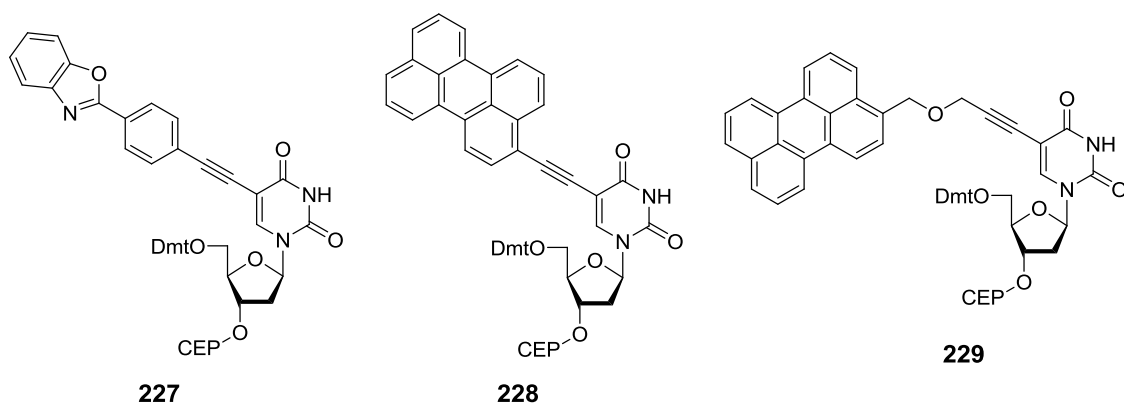


**Рис. 12.** Спектры флуоресценции модифицированных олигонуклеотидов и их дуплексов в водном буфере 0.1 М NaCl, 0.01 М  $KH_2PO_4/KHPO_4$ , pH 7.0; возбуждение при 370 нм; (а) конъюгаты **224** (1), **225** (2), **226** (3); (б) конъюгат **224** (1) и его дуплекс с комплементарной ДНК (2); (в) конъюгат **225** (1) и его дуплекс с комплементарной ДНК (2); (г) конъюгат **226** (1) и его дуплекс с комплементарной ДНК (2). Концентрация растворов  $1 \times 10^{-6}$  М (**224** и его дуплекс) и  $5 \times 10^{-8}$  М (**225**, **226** и их дуплексы).

Эмиссия одиночной метки в конъюгате **224** в значительной степени потушена и для сравнения его флуоресценции с таковой для конъюгатов **225** и **226** приходится использовать в 20 раз большую концентрацию (**рис. 12а**). Форма кривой эмиссии свидетельствует о наличии эксиплекса (по-видимому, с участием основания соседнего нуклеозида), поскольку интенсивность в области коротковолнового максимума 410 нм уступает сигналу в более длинноволновой области 430–470 нм. При гибридизации с комплементарным олигонуклеотидом взаимодействие флуорофора с окружением усиливается и максимум эмиссии смещается в область 470 нм (**рис. 12б**). Интенсивность свечения неожиданно возрастает в 3.5 раза. Это может свидетельствовать о расположении пиренового остатка и исключении дополнительных взаимодействий с нуклеиновыми основаниями, кроме стэкинга. Предполагают, что механизм тушения эмиссии красителя **222** включает первоначальное фотоиндуцированное разделение заряда в пределах молекулы красителя (сдвиг электрона с пирена на урацил) с последующим переносом электрона на соседний тимин.

Флуоресценция конъюгатов **225** и **226** на два порядка более интенсивная, чем конъюгата **224** и состоит, по-видимому, из комбинации эмиссии эксиплекса и внутрицепочечного эксимера. Интенсивность и форма спектров олигонуклеотидов **225** и **226** не слишком сильно меняются при гибридизации (**рис. 12в,г**).

Для дальнейшего изучения закономерностей изменения спектральных свойств при гибридизации были синтезированы похожие нуклеозидные производные других флуорофоров **227–229**. В нуклеозиде **227** к урацилу с помощью тройной связи присоединён известный флуорофор 2-фенилбензоксазол. Соединение **228** аналогично **223**, но содержит вместо пиренового остатка периленовый, также сопряжённый с урацилом с помощью тройной связи. В нуклеозиде **229** по сравнению с нуклеозидом **228** присутствует гибкий трёхатомный линкер  $\text{CH}_2\text{OCH}_2$  между тройной связью и остатком перилена. Такой реагент позволяет сравнить свойства жёстко закреплённого, сопряжённого с урацилом перилена и несопряжённого перилена, обладающего большой конформационной свободой.



Из реагентов **223** и **227–229** были получены олигонуклеотидные конъюгаты, например, производные одной последовательности 5'-ССА-**223**-ТАСАТССАГАС (**230**), 5'-ССА-**227**-

TACATCCAGAC (231), 5'-CCA-228-TACATCCAGAC (232), 5'-CCA-229-TACATCCAGAC (233), 5'-CCA-228-228-ACATCCAGAC (234), 5'-CCA-229-229-ACATCCAGAC (235), 5'-CCAT-229-ACA-229-CCAGAC (236). Проведено сравнение влияния заместителей на стабильность образуемых ими комплексов с комплементарной последовательностью. Оказалось, что нуклеотиды 223, 227 и 228 немного дестабилизируют дуплекс, причём величина эффекта, видимо, зависит от нуклеотидного контекста. Нуклеотид 229, наоборот, оказывает небольшое стабилизирующее влияние. Действительно, молекулярное моделирование показало, что, если для дуплекса 232×ДНК возможна только структура с вынесенным из большой бороздки в растворитель периленом (рис. 13а), то для дуплекса 233×ДНК с периленом на гибком линкере возможна не только аналогичная структура (рис. 13б), но и укладывание перилена в большую бороздку (рис. 13в).

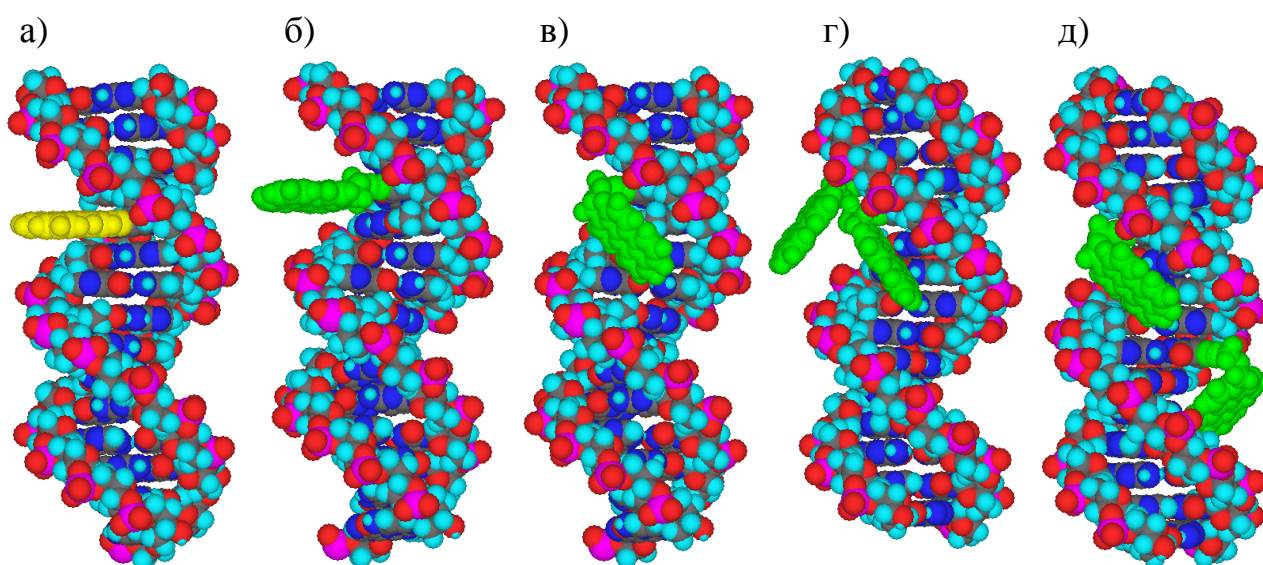
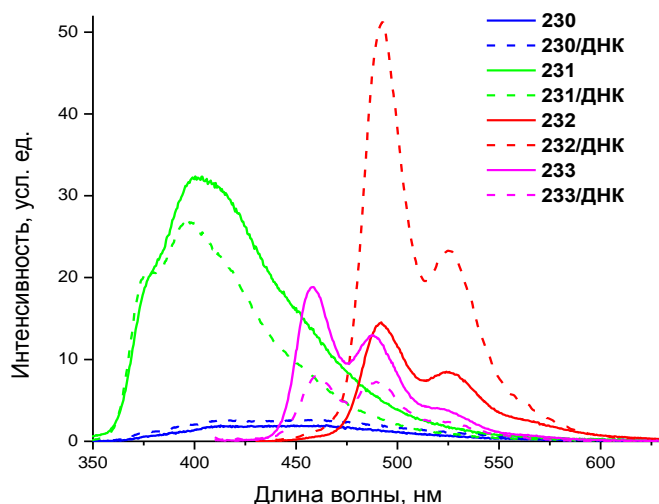


Рис. 13. Молекулярные модели ДНК дуплексов модифицированных олигонуклеотидов 232 (а), 233 (б, в), 235 (г) и 236 (д) с комплементарной ДНК. Перилена из 228 выделен жёлтым, а из 229 – зелёным.

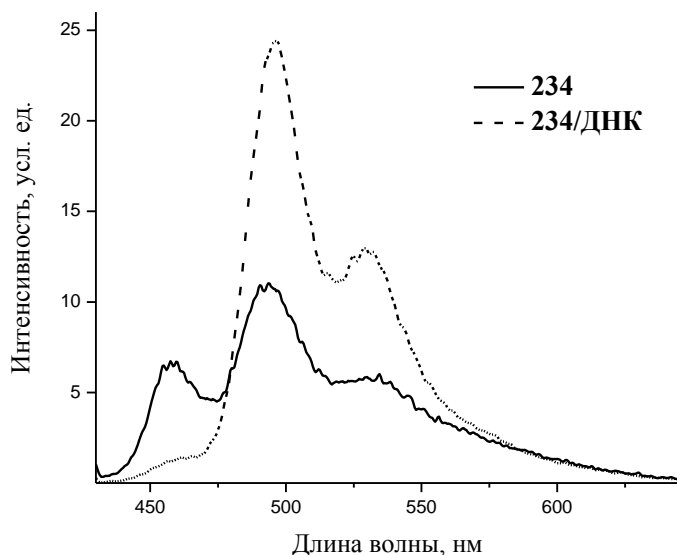
По-видимому, реализуется именно структура рис. 13в, поскольку структуры с рис. 13а и рис. 13б весьма похожи и весьма маловероятно, чтобы их влияние на температуру плавления было противоположным. А различное положение периленов на рис. 13а и 13в хорошо коррелирует с наблюдаемым эффектом ( $\Delta T_m$   $-3.9^\circ\text{C}$  для 232×ДНК и  $+2.9^\circ\text{C}$  для 233×ДНК). Дополнительным подтверждением служат данные для дуплексов, содержащих два нуклеозида 229. Действительно, в дуплексе 235×ДНК модифицированные нуклеозиды расположены рядом, и поэтому уложиться в большую бороздку может только один из периленовых остатков (рис. 13г); стабилизация дуплекса при этом составляет  $+2.9^\circ\text{C}$ . В дуплексе 236×ДНК модифицированные нуклеозиды разделены тремя парами оснований, оба перилена могут уложиться в большую бороздку (рис. 13д), а  $\Delta T_m$  составляет  $+4.7^\circ\text{C}$ .

Нуклеозиды 227–229 были исследованы как одиночные флуоресцентные метки в ДНК-зондах. Флуоресценция каждого из этих нуклеозидов гораздо интенсивнее флуоресценции пиренового производного 223 (рис. 14). Эмиссия фенилбензоксазольной метки (конъюгат 231)

практически не реагирует на гибридизацию. Для двух периленовых производных наблюдается отчётливый противоположный эффект: эмиссия несопряжённого перилена из нуклеозида **229** в результате гибридизации тушится (уменьшается в 3 раза; конъюгат **233**), а эмиссия нуклеозида **228** возрастает в 3 раза (квантовый выход возрастает с 0.10 до 0.34; конъюгат **232**). Это согласуется с



**Рис. 14.** Спектры флуоресценции модифицированных олигонуклеотидов **230–233** и их дуплексов с комплементарной ДНК. Возбуждение при 340 нм (**230**), 330 нм (**231**), 420 нм (**232**) и 400 нм (**233**); концентрации олигонуклеотидов и дуплексов  $3 \times 10^{-7}$  М.



**Рис. 15.** Изменение вида кривой флуоресценции олигонуклеотида **234** при гибридизации с комплементарной ДНК; возбуждение при 420 нм; концентрации олигонуклеотида и дуплекса  $3 \times 10^{-7}$  М.

предположением, что перилена на жёстком линкере после гибридизации изолируется от взаимодействий с основаниями, а на гибком – наоборот, укладывается в бороздку.

Интересное свойство нуклеозида **228** было обнаружено при изучении спектров флуоресценции олигонуклеотида **234** и его дуплекса с комплементарной ДНК (рис. 15). В спектре конъюгата **234** присутствует коротковолновой максимум (457 нм), исчезающий после образования дуплекса. Возможно, появление этого максимума связано с “выворачиванием” одного из остатков перилена (вращением вокруг одной из связей вблизи тройной связи) в олигонуклеотиде **234**. В этом случае полиароматическая часть нуклеозида **228** теряет сопряжение с нуклеиновым основанием и флуоресцирует как перилена ( $\lambda_{\text{макс}} \sim 460$  нм). Вероятно, в одноцепочечном олигонуклеотиде **234** два гидрофобных остатка перилена агрегируют и “закрываются” относительно

относительно гидрофобными нуклеиновыми основаниями, что может приводить к выведению из сопряжения одного из остатков перилена. При гибридизации стерические препятствия исчезают, и в спектре флуоресценции видны только полосы сопряжённого нуклеозида **228**.

Описанные в данном разделе красители могут составлять весьма эффективные донор-акцепторные пары. Например, в случае расположения сопряжённых пиренового и периленового

нуклеозидов в различных цепях и на небольших расстояниях друг от друга (дуплексы **237**, **238**, **239**) наблюдается практически полный перенос энергии флуоресценции – детектируется только эмиссия флуорофора–акцептора (рис. 16). Если же донором для сопряжённого периленового нуклеозида является бензоксазольный нуклеозид **227**, то эффективность переноса энергии зависит от взаимного расположения красителей: если донор и акцептор поменять местами, то эта эффективность снижается и наблюдается интенсивная эмиссия донора (дуплекс **241** на рис. 17). Таким образом, 5-замещённые пиримидины являются полезными флуоресцентными метками.

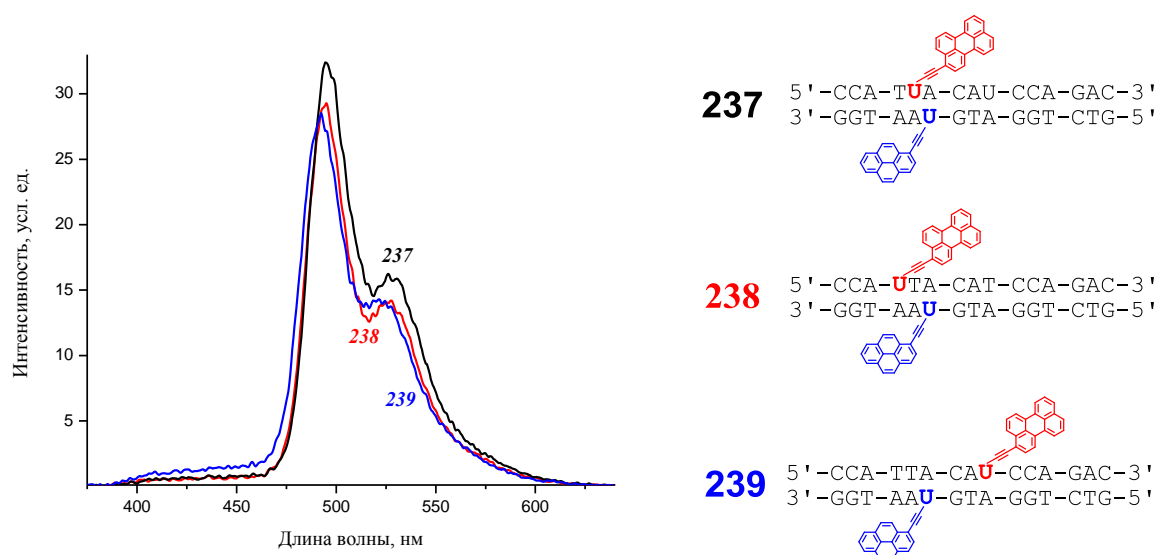


Рис. 16. Перенос энергии в паре модифицированных нуклеозидов **223**→**228** в дуплексах **237**–**239**; возбуждение при 340 нм; концентрации дуплексов  $3 \times 10^{-7}$  М.

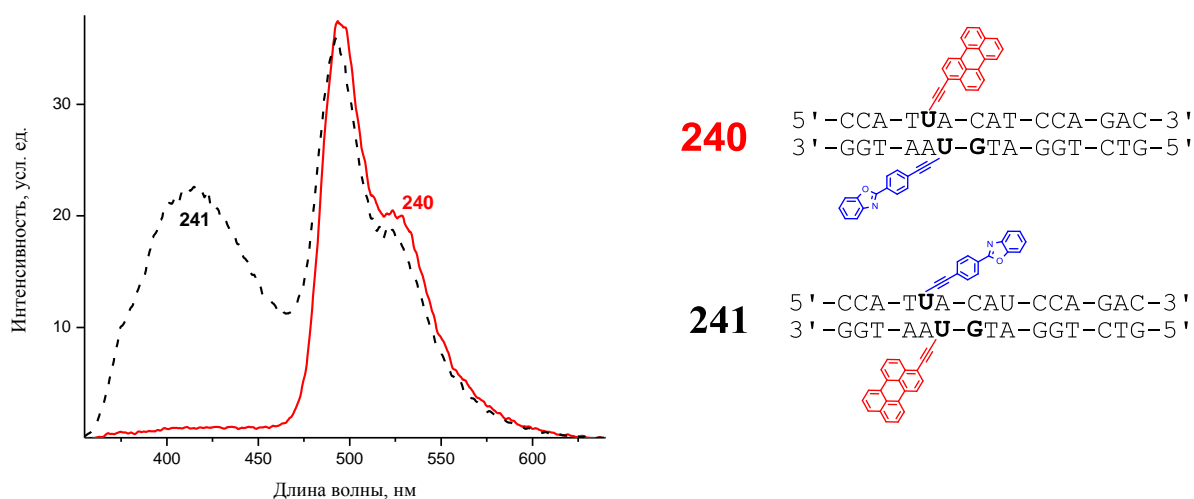


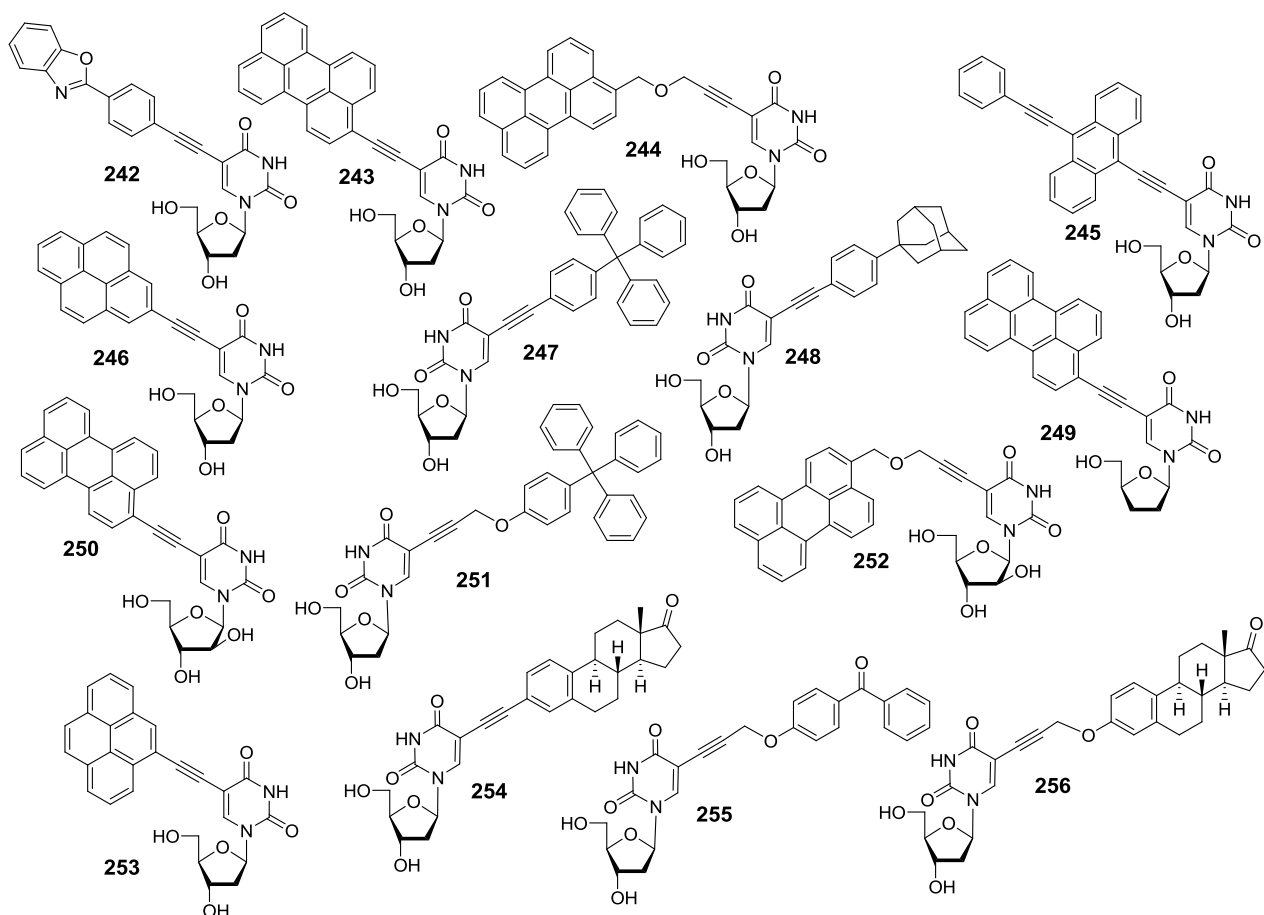
Рис. 17. Перенос энергии в паре модифицированных нуклеозидов **227**→**228** в дуплексах **240**, **241**; возбуждение при 340 нм; концентрации дуплексов  $3 \times 10^{-7}$  М.

### 3.2. 5-Арилэтинил-пиримидиновые нуклеозиды с объёмным ароматическим заместителем – новый класс противовирусных нуклеозидов

Уже четыре десятилетия идёт поиск эффективных противовирусных препаратов среди вновь синтезируемых модифицированных нуклеозидов. Эта работа носит характер как случайных открытий, так и целенаправленного повышения активности уже существующих соединений.



Несмотря на впечатляющий прогресс в этой области фармацевтической химии, приведший к получению нескольких десятков препаратов, медицина по-прежнему нуждается в новых и более эффективных средствах терапии вирусных инфекций. Особенно остро ощущается необходимость новых активных веществ для борьбы с вирусными штаммами, резистентными к действию распространенных лекарств. На сегодняшний день лечение многих вирусных заболеваний (герпеса, гепатита С и др.) осуществляется аналогами нуклеозидов. Сущность механизма действия этих препаратов заключается в подавлении препаратом репликации ДНК вируса.



Синтезированные первоначально для исследования флуоресцентных свойств нуклеозиды **222**, **242** и **243** в биологических испытаниях показали заметную активность против вируса простого герпеса типа 1 (ВПГ-1) – единицы мкМ для 50% ингибирования репликации (данные получены В.Л. Андроновой и Г.А. Галеговым, ГНИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН). Оказалось, что эти соединения активны также по отношению к ацикловир-резистентным штаммам ВПГ-1, что свидетельствует о том, что механизм их противовирусного действия ненуклеозидный, то есть не включает стадию их превращения в трифосфаты. После этого нами был предпринят синтез различных 5-алкинильных производных пиримидиновых нуклеозидов, **245–256** и других, и проведена проверка их биологической активности. Оказалось, что выраженную противогерпетическую активность проявляют соединения, содержащие только жёсткий этинильный линкер и присоединённый к нему остаток ПАУ. Введение в линкер гибких элементов

приводило к практически полному исчезновению противовирусного действия и резкому возрастанию цитотоксичности (на примере нуклеозидов **243** и **244**). Интересно, что именно периленэтинильный остаток важен для противовирусной активности – варьирование сахара (нуклеозиды **249**, **250**) приводит к соединениям с похожей активностью. Кроме того, по данным Л. Шанга (Университет Альберты, Эдмонтон, Канада), полученные периленовые нуклеозиды способны также ингибировать репликацию вируса герпеса типа 2, вирусов ветряной оспы (*Varicella zoster*), Синдбис и гепатита С, причём активность веществ весьма высока, от 183 нМ (гепатит С) до 5 нМ (*Varicella zoster*) для 50% ингибирования заражения (данные для нуклеозида **243**). Действие препаратов, по-видимому, основано на ингибировании проникновения вируса в клетку. Таким образом, обнаружен новый класс противовирусных нуклеозидов с ненуклеозидным механизмом действия.

— \* \* \* —

## ВЫВОДЫ

1. Разработан ряд ненуклеотидных реагентов с различной псевдосахарной основой (**1,3-бутандиол**, **3*R*,5*S*-3-гидрокси-5-гидроксиметилпирролидин**, ***R*-** и ***S*-энантимеры 2,4-дигидроксибутирамидов**, **6-аминогексанол**, ***транс*-4-аминоциклогексанол**) для модификации олигонуклеотидов в процессе твердофазного автоматизированного олигонуклеотидного синтеза. Набор модификаций включает:
  - а) введение в олигонуклеотиды функциональных и реакционноспособных групп (алифатическая амино- и тиольная группа, терминальный ацетилен, имидазол, биотин);
  - б) мечение олигонуклеотидов флуоресцентными красителями (пирен, перилен, 1-фенилэтинилпирен, 9,10-бис(фенилэтинил)антрацен, флуоресцеин, тетраметилродамин, цианиновые красители **Cy3**, **Cy3.5**, **Cy5**, **Cy5.5**);
  - в) мечение олигонуклеотидов отщепляемыми масс-спектрометрическими метками на основе *S*-триарилметильных соединений.
2. Синтезированы функциональные производные 1-фенилэтинилпирена (**1-PEPy**) и 9,10-бис(фенилэтинил)антрацена (**BPEA**) и применены для мечения олигонуклеотидов. Флуоресценция 1-PEPy сдвинута по сравнению с пиреном в длинноволновую область, а время жизни возбуждённого состояния на два порядка меньше, чем у пирена. 1-PEPy гораздо меньше восприимчив к тушению флуоресценции нуклеиновыми кислотами, чем пирен, и его квантовый выход флуоресценции высок (**0.3–0.9**). Обнаружена способность 1-PEPy к образованию эксимеров. 1-PEPy и BPEA представляют собой донорно-акцепторную пару, для которой наблюдается эффективный перенос энергии.

3. Синтезированы азидопроизводные ряда флуоресцентных красителей (перилен, диимид перилен-3,4,9,10-тетракарбоновой кислоты, флуоресцеин, тетраметилродамин, 2',7'-диметокси-4',5'-дихлорфлуоресцеин (JOE), ROX, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5), позволяющие проводить эффективное пост-мечение синтетических алкинсодержащих олигонуклеотидов с помощью реакции [3+2] диполярного циклоприсоединения.
4. Получен ряд нуклеозидных производных, модифицированных функциональными группами и флуоресцентными красителями по 2'-положению углеводного остатка (производные уридин-2'-рибо- и -2'-арабино-карбаматов, а также 2'-амино-LNA).
5. В качестве эксимеробразующих флуоресцентных меток предложены бис- и трис(фенилэтинил)пиренилкарбоксамиды. Изучены их спектральные свойства как производных 2'-амино-LNA и влияние на стабильность дуплекса с комплементарными и мутантными (содержащими однонуклеотидные замены) последовательностями.
6. На основе различных производных пирена предложены гомогенные флуоресцентные методы детекции однонуклеотидных замен, основанные на изменении интенсивности и соотношения эксимерной и мономерной эмиссии.
7. Обнаружено явление и исследованы структурные предпосылки образования межцепочечного эксимера двумя остатками пирена, 1-фенилэтинилпирена и 4-фенилэтинилпирена в большой бороздке ДНК-дуплекса.
8. Получены флуоресцентные производные нуклеозидов, в которых флуорофор сопряжён с нуклеиновым основанием с помощью тройной связи. Изучено изменение флуоресценции этих нуклеозидов в составе олигонуклеотидов после гибридизации с комплементарной последовательностью. У 5-арилэтинил-пиримидиновых нуклеозидов с объёмными ароматическими заместителями обнаружена противовирусная активность в отношении ряда оболочечных вирусов (вирус гепатита С, Синдбис, Varicella zoster, вирусы простого герпеса типа 1 и 2).

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### СТАТЬИ

#### Обзорные статьи:

1. Коршун В.А., Берлин Ю.А. Введение нерадиоактивных репортерных групп в синтетические олигонуклеотиды и их детекция. *Биоорганическая химия*, 1994, 20, № 6, 565–616.
2. Коршун В.А., Манасова Е.В., Берлин Ю.А. Алкинированные нуклеозиды и их аналоги. *Биоорганическая химия*, 1997, 23, № 5, 324–387.
3. Прохоренко И.А., Коршун В.А., Берлин Ю.А. Резонансный перенос энергии флуоресценции в исследовании нуклеиновых кислот. *Биоорганическая химия*, 1999, 25, № 11, 838–847.

4. Стеценко Д.А., Арзуманов А.А., **Коршун В.А.**, Гейт М.Дж. Пептид-олигонуклеотидные конъюгаты как антисмысловые агенты нового поколения. *Молекул. биология*, **2000**, 34, № 6, 998–1006.
5. Shchepinov M.S., **Korshun V.A.** Recent applications of bifunctional trityl groups. *Chem. Soc. Rev.*, **2003**, 32, No. 3, 170–180.
6. Устинов А.В., Степанова И.А., Дубнякова В.В., Зацепин Т.С., Ножевникова Е.В., **Коршун В.А.** Модификация нуклеиновых кислот с помощью реакции [3+2]-диполярного циклоприсоединения азидов и алкинов. *Биоорганич. химия*, **2010**, 36, № 4, 437–481.

#### Главы из книг:

7. **Korshun V.A.**, Stetsenko D.A., Gait M.G. Uridine 2'-carbamates: facile tools for oligonucleotide 2'-functionalization. *Curr. Protocols Nucl. Acid Chem.*, **2003**, 4.21.1–4.21.26.
8. Prokhorenko I.A., Astakhova I.V., Momynaliev K.T., Zatsepin T.S., **Korshun V.A.** Phenylethynylpyrene excimer forming hybridization probes for fluorescence SNP detection. *Meth. Mol. Biol.*, **2009**, 578 (*Single Nucleotide Polymorphisms*. A.A. Komar (ed.)), 209–222.
9. Birikh K.R., Bernad P.L., Shmanai V.V., Malakhov A.D., Shchepinov M.S., **Korshun V.A.** SNP detection using trityl mass tags. *Meth. Mol. Biol.*, **2009**, 578 (*Single Nucleotide Polymorphisms*. A.A. Komar (ed.)), 345–361.

#### Статьи по ненуклеозидным реагентам для мечения олигонуклеотидов:

10. Prokhorenko I.A., **Korshun V.A.**, Petrov A.V., Gontarev S.V., Berlin Y.A. Incorporation of a pyrene nucleoside analogue into synthetic oligodeoxynucleotides using a nucleoside-like synthon. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1995**, 5, No. 18, 2081–2084.
11. **Korshun V.A.**, Pestov N.B., Nozhevnikova E.V., Prokhorenko I.A., Gontarev S.V., Berlin Y.A. Reagents for multiple non-radioactive labelling of oligonucleotides. *Synth. Commun.*, **1996**, 26, No. 13, 2531–2547.
12. Балакин К.В., **Коршун В.А.**, Прохоренко И.А., Малеев Г.В., Куделина И.А., Гонтарев С.В., Берлин Ю.А. Новый реагент для мечения биомолекул – активированное производное пиренового бихромофора с эксимерной флуоресценцией. *Биоорганич. химия*, **1997**, 23, № 1, 33–41.
13. **Korshun V.A.**, Prokhorenko I.A., Gontarev S.V., Skorobogatyi M.V., Balakin K.V., Manasova E.V., Malakhov A.D., Berlin Y.A. New pyrene derivatives for fluorescent labeling of oligonucleotides. *Nucleosides & Nucleotides*, **1997**, 16, No. 7/9, 1461–1464.
14. Балакин К.В., Малахов А.Д., **Коршун В.А.**, Берлин Ю.А. Метод синтеза олигонуклеотидов, меченных пиреном. *Биоорганич. химия*, **1998**, 24, № 5, 388–390.
15. Balakin K.V., **Korshun V.A.**, Mikhalev I.I., Maleev G.V., Malakhov A.D., Prokhorenko I.A., Berlin Y.A. Conjugates of oligonucleotides with polyaromatic fluorophores as promising DNA probes. *Biosensors & Bioelectronics*, **1998**, 13, No. 7/8, 771–778.
16. Balakin K.V., **Korshun V.A.**, Esipov D.S., Mikhalev I.I., Berlin Y.A. Perylene-labeled oligonucleotide as a probe in homogeneous hybridization assay. *Nucleosides & Nucleotides*, **1999**, 18, No. 6/7, 1279–1280.
17. **Korshun V.A.**, Balakin K.V., Proskurina T.S., Mikhalev I.I., Malakhov A.D., Berlin Y.A. A pyrene *seco*-pseudonucleoside in constructing interaction-sensitive fluorescent DNA probes. *Nucleosides & Nucleotides*, **1999**, 18, No. 11/12, 2661–2676.
18. Малахов А.Д., Прохоренко И.А., Кузницова С.В., Скоробогатый М.В., **Коршун В.А.**, Берлин Ю.А. Синтез нового флуоресцентного псевдонуклеозида на основе 9,10-бисфенилэтинилантацена и его введение в олигонуклеотиды. *Биоорганич. химия*, **1999**, 25, № 12, 933–937.
19. Shchepinov M.S., **Korshun V.A.**, Egeland R.D., Southern E.M. Tritylisation of pyrene, perylene and coronene: a new family of switchable fluorescent labels. *Tetrahedron Letters*, **2000**, 41, No. 25, 4943–4948.
20. Малахов А.Д., **Коршун В.А.**, Берлин Ю.А. Синтез и флуоресцентные свойства олигонуклеотидов, содержащих новую флуоресцентную метку – *n*-(2-бензоксазол)толан. *Биоорганич. химия*, **2001**, 27, № 6, 462–465.
21. Shchepinov M.S., **Korshun V.A.** Design of multidye systems for FRET-based applications. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, **2001**, 20, No. 4/7, 369–374.
22. Dioubankova N.N., Malakhov A.D., Stetsenko D.A., **Korshun V.A.**, Gait M.J. (*R*)-2,4-Dihydroxybutyramide *seco*-pseudonucleosides: new versatile homochiral synthons for synthesis of modified oligonucleotides. *Org. Lett.*, **2002**, 4, No. 26, 4607–4610.

23. Malakhov A.D., Skorobogaty M.V., Prokhorenko I.A., Gontarev S.V., Kozhich D.T., Stetsenko D.A., Stepanova I.A., Shenkarev Z.O., Berlin Y.A., **Korshun V.A.** 1-Phenylethynylpyrene and 9,10-bis(phenylethynyl)anthracene, useful fluorescent dyes for DNA labeling: excimer formation and energy transfer. *Eur. J. Org. Chem.*, **2004**, No. 6, 1298–1307.
24. Дюбанкова Н.Н., Малахов А.Д., Стеценко Д.А., **Коршун В.А.** Детекция точечных мутаций с помощью ДНК-зондов, меченных пиреном. *Изв. АН, Сер. хим.*, **2004**, № 2, 443–449.
25. Bernad P.L., Jr, Khan S., **Korshun V.A.**, Southern E.M., Shchepinov M.S. S(O)-Pixyl protecting group as efficient mass-tag. *Chem. Commun.*, **2005**, No. 27, 3466–3468.
26. Khan S., Bernad P.L., **Korshun V.A.**, Southern E.M., Shchepinov M.S. Synthesis of S-pixyl derivatives for mass spectrometric application. *Synlett*, **2005**, No. 16, 2453–2456.
27. Квач М.В., Гонтарев С.В., Прохоренко И.А., Степанова И.А., Шманай В.В., **Коршун В.А.** Простой реагент для синтеза олигонуклеотидов, меченных 3,3,3',3'-тетраметил-2,2'-индиодикарбоцианином. *Изв. АН, Сер. хим.*, **2006**, № 1, 154–158.
28. Dioubankova N.N., Malakhov A.D., Stetsenko D.A., Gait M.J., **Korshun V.A.** Phosphoramidites and solid supports based on N-substituted 2,4-dihydroxybutyramides: universal reagents for synthesis of modified oligonucleotides. *Tetrahedron*, **2006**, 62, No. 29, 6762–6773.
29. Устинов А.В., **Коршун В.А.** Олигонуклеотиды, содержащие остатки арилацетилена: синтез и постсинтетическая модификация с помощью 1,3-диполярного циклоприсоединения. *Изв. АН, Сер. хим.*, **2006**, № 7, 1220–1226.
30. Prokhorenko I.A., Malakhov A.D., Kozlova A.A., Momynaliev K., Govorun V.M., **Korshun V.A.** Phenylethynylpyrene-labeled oligonucleotide probes for excimer fluorescence SNP-analysis of 23S rRNA gene in clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* strains. *Mutation Res.*, **2006**, 599, No. 1/2, 144–151.
31. Kvach M.V., Tsybulsky D.A., Ustinov A.V., Stepanova I.A., Bondarev S.L., Gontarev S.V., **Korshun V.A.**, Shmanai V.V. 5(6)-Carboxyfluorescein revisited: new protecting group, separation of isomers, and their spectral properties on oligonucleotides. *Bioconjugate Chem.*, **2007**, 18, No. 5, 1691–1696.
32. Ustinov A.V., Dubnyakova V.V., **Korshun V.A.** Perylene diimide–oligonucleotide conjugates constructed by click chemistry. *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids*, **2007**, 26, No. 6/7, 751–754.
33. Kvach M.V., Prokhorenko I.A., Ustinov A.V., Gontarev S.V., Shmanai V.V., **Korshun V.A.** Reagents for the selective immobilization of oligonucleotides on solid supports. *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids*, **2007**, 26, No. 6/7, 809–813.
33. Ustinov A.V., Dubnyakova V.V., **Korshun V.A.** A convenient 'click chemistry' approach to perylene diimide–oligonucleotide conjugates. *Tetrahedron*, **2008**, 64, No. 7, 1467–1473.
35. Kvach M.V., Ustinov A.V., Stepanova I.A., Malakhov A.D., Skorobogaty M.V., Shmanai V.V., **Korshun V.A.** Convenient synthesis of cyanine dyes: reagents for labeling of biomolecules. *Eur. J. Org. Chem.*, **2008**, No. 12, 2107–2117.
36. Filichev V.V., Astakhova I.V., Malakhov A.D., **Korshun V.A.**, Pedersen E.B. DNA glue: 1-, 2- and 4-ethynylpyrenes in the structure of twisted intercalating nucleic acids (TINAs), DNA duplexes/triplexes and interstrand excimer formation. *Nucl. Acids Symp. Ser.*, **2008**, No. 52, 347–348.
37. Filichev V.V., Astakhova I.V., Malakhov A.D., **Korshun V.A.**, Pedersen E.B. 1-, 2-, and 4-Ethynylpyrenes in the structure of twisted intercalating nucleic acids: structure, thermal stability, and fluorescence relationship. *Chem. Eur. J.*, **2008**, 14, No. 32, 9968–9980.
38. Birikh K.R., **Korshun V.A.**, Bernad P.L., Malakhov A.D., Milner N., Khan S., Southern E.M., Shchepinov M.S. Novel mass tags for single nucleotide polymorphism detection. *Anal. Chem.*, **2008**, 80, No. 7, 2342–2350.
39. Ustinov A.V., Shmanai V.V., Patel K., Stepanova I.A., Prokhorenko I.A., Astakhova I.V., Malakhov A.D., Skorobogaty M.V., Bernad P.L., Jr, Khan S., Shahgholi M., Southern E.M., **Korshun V.A.**, Shchepinov M.S. Reactive trityl derivatives: stabilised carbocation mass-tags for life sciences applications. *Org. Biomol. Chem.*, **2008**, 6, No. 24, 4593–4608.
40. Kvach M.V., Stepanova I.A., Prokhorenko I.A., Stupak A.P., Bolibrukh D.A., **Korshun V.A.**, Shmanai V.V. Practical synthesis of isomerically pure 5- and 6-carboxytetramethylrhodamines, useful dyes for DNA probes. *Bioconjugate Chem.*, **2009**, 20, No. 8, 1673–1682.

## Статьи по сахар-модифицированным производным пиримидиновых нуклеозидов и их флуоресценции в составе ДНК:

41. **Korshun V.A.**, Stetsenko D.A., Gait M.J. Novel uridin-2'-yl carbamates: synthesis, incorporation into oligodeoxyribonucleotides, and remarkable fluorescence properties of 2'-pyren-1-ylmethylcarbamate. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **2002**, No. 8, 1092–1104.
42. Dioubankova N.N., Malakhov A.D., Stetsenko D.A., Gait M.J., Volynsky P.E., Efremov R.G., **Korshun V.A.** Pyrenemethyl *ara*-uridine-2'-carbamate: a strong interstrand excimer in the major groove of a DNA duplex. *ChemBioChem*, **2003**, 4, No. 9, 841–847.
43. Prokhorenko I.A., Dioubankova N.N., **Korshun V.A.** Oligonucleotide conjugates of Nile Red. *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids*, **2004**, 23, No.1/2, 509–520.
44. Dioubankova N.N., Malakhov A.D., Shenkarev Z.O., **Korshun V.A.** Oligonucleotides containing new fluorescent 1-phenylethynylpyrene and 9,10-bis(phenylethynyl)anthracene uridine-2'-carbamates: synthesis and properties. *Tetrahedron*, **2004**, 60, No. 21, 4617–4626.
45. Astakhova I.V., Malakhov A.D., Stepanova I.A., Ustinov A.V., Bondarev S.L., Paramonov A.S., **Korshun V.A.** 1-Phenylethynylpyrene (1-PEPy) as refined excimer forming alternative to pyrene: case of DNA major groove excimer. *Bioconjugate Chem.*, **2007**, 18, No. 6, 1972–1980.
46. Lindegaard D., Madsen A.S., Astakhova I.A., Malakhov A.D., Babu B.R., **Korshun V.A.**, Wengel J. Pyreneperylene as a FRET pair coupled to the N2'-functionality of 2'-amino-LNA. *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, 16, No. 1, 94–99.
47. Астахова И.В., **Коршун В.А.** 2- и 4-Фенилэтинилпирены – новые флуоресцентные метки для ДНК. *Биоорганическая химия*, **2008**, 34, № 4, 570–572.
48. Astakhova I.V., **Korshun V.A.**, Wengel J. Novel long-wave emission fluorochrome based upon perylene-3-ylcarbonyl-functionalized 2'-amino-LNA. *Collections Symp. Ser.*, **2008**, 10, 307–308.
49. Astakhova I.V., **Korshun V.A.**, Wengel J. (Phenylethynyl)pyrenes attached to 2'-amino-LNA: novel fluorescent dyes with the advantages of long-wave emission, high fluorescence quantum yields and excimer formation. *Collections Symp. Ser.*, **2008**, 10, 491–495.
50. Astakhova I.V., **Korshun V.A.**, Jahn K., Kjems J., Wengel J. Perylene attached to 2'-amino-LNA: synthesis, incorporation into oligonucleotides, and remarkable fluorescence properties *in vitro* and in cell culture. *Bioconjugate Chem.*, **2008**, 19, No. 10, 1995–2007.
51. Astakhova I.V., **Korshun V.A.**, Wengel J. Highly fluorescent conjugated pyrenes in nucleic acid probes: (phenylethynyl)pyrenecarbonyl-functionalized locked nucleic acids. *Chem. Eur. J.*, **2008**, 14, No. 35, 11010–11026.
52. Astakhova I.V., Lindegaard D., **Korshun V.A.**, Wengel J. Novel interstrand communication systems within DNA duplexes based on 1-, 2- and 4-(phenylethynyl)pyrenes attached to 2'-amino-LNA: high-affinity hybridization and fluorescence sensing. *Chem. Commun.*, **2010**, 46, No. 44, 8362–8364.
53. Astakhova I.V., Ustinov A.V., **Korshun V.A.**, Wengel J. LNA for optimization of fluorescent oligonucleotide probes: improved spectral properties and target binding. *Bioconjugate Chem.*, **2011**, 22, No. 40, 533–539.

## Статьи по 5-алкинильным производным 2'-дезоксинуридинов, их противовирусным свойствам и флуоресценции в составе ДНК:

54. **Коршун В.А.**, Манасова Е.В., Балакин К.В., Прохоренко И.А., Бучацкий А. Г., Берлин Ю.А. 5-(1-Пиренилэтинил)-2'-дезоксинуридин, новое флуоресцентное нуклеозидное производное. *Биоорганическая химия*, **1996**, 22, № 12, 923–925.
55. **Korshun V.A.**, Manasova E.V., Balakin K.V., Malakhov A.D., Perepelov A.V., Sokolova T.A., Berlin Y.A. New fluorescent nucleoside derivatives – 5-alkynylated 2'-deoxyuridines. *Nucleosides & Nucleotides*, **1998**, 17, No. 9/11, 1809–1812.
56. Малахова Е.В., Малахов А.Д., Кузницова С.В., Варнавский О.П., Кадуцкий А.П., Кожич Д.Т., **Коршун В.А.**, Берлин Ю.А. Реагенты для введения в олигонуклеотиды флуоресцентного 2-фенилбензоксазольного производного дезоксиуридина. *Биоорганическая химия*, **1998**, 24, № 9, 688–695.
57. Малахов А.Д., Малахова Е.В., Кузницова С.В., Гречишников И.В., Прохоренко И.А., Скоробогатый

- М.В., **Коршун В.А.**, Берлин Ю.А. Синтез и флуоресцентные свойства 5-(1-пиренилэтинил)-2'-дезоксинуридинсодержащих олигонуклеотидов. *Биоорганическая химия*, **2000**, 26, № 1, 39–50.
58. Андропова В.Л., Скоробогатый М.В., Манасова Е.В., Берлин Ю.А., **Коршун В.А.**, Галегов Г.А. Противовирусная активность некоторых 5-арилэтинильных производных 2'-дезоксинуридина. *Биоорганическая химия*, **2003**, 29, № 3, 289–294.
59. Pchelintseva A.A., Skorobogatij M.V., Petrunina A.L., Andronova V.L., Galegov G.A., Astakhova I.V., Ustinov A.V., Malakhov A.D., **Korshun V.A.** Synthesis and evaluation of anti-HSV activity of new 5-alkynyl-2'-deoxyuridines. *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids*, **2005**, 24, No. 5/7, 923–926.
60. Skorobogatij M.V., Pchelintseva A.A., Ustinov A.V., **Korshun V.A.**, Malakhov A.D. Perylene attached to DNA through stiff or flexible linker: duplex stability and FRET. *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids*, **2005**, 24, No. 5/7, 931–934.
61. Андропова В.Л., Пчелинцева А.А., Устинов А.В., Петрунина А.Л., **Коршун В.А.**, Скоробогатый М.В., Галегов Г.А. Противогерпетическая активность 5-алкинильных производных 2'-дезоксинуридина. *Вопросы вирусологии*, **2006**, № 1, 34–38.
62. Skorobogatyj M.V., Kvach M.V., Zhylinskaya M.A., Yarmolinsky D.G., **Korshun V.A.**, Shmanai V.V. 5-Arylethynyl-2'-deoxyuridines: energy transfer and SNP-detection. *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids*, **2007**, 26, No. 6/7, 767–772.
63. Skorobogatyj M.V., Pchelintseva A.A., Petrunina A.L., Stepanova I.A., Andronova V.L., Galegov G.A., Malakhov A.D., **Korshun V.A.** 5-Alkynyl-2'-deoxyuridines, containing bulky aryl groups: evaluation of structure–anti-HSV-1 activity relationship. *Tetrahedron*, **2006**, 62, No. 6, 1279–1287.
64. Skorobogatyj M.V., Ustinov A.V., Stepanova I.A., Pchelintseva A.A., Petrunina A.L., Andronova V.L., Galegov G.A., Malakhov A.D., **Korshun V.A.** 5-Arylethynyl-2'-deoxyuridines, compounds active against HSV-1. *Org. Biomol. Chem.*, **2006**, 4, No. 6, 1091–1096.
65. Skorobogatyj M.V., Malakhov A.D., Pchelintseva A.A., Turban A.A., Bondarev S.L., **Korshun V.A.** Fluorescent 5-alkynyl-2'-deoxyuridines: high emission efficiency of a conjugated perylene nucleoside in a DNA duplex. *ChemBioChem*, **2006**, 7, No. 5, 810–816.
66. St. Vincent M.R., Colpitts C.C., Ustinov A.V., Muqadas M., Joyce M.A., Barsby N.L., Eband R.F., Eband R.M., Khramyshev S.A., Valueva O.A., **Korshun V.A.**, Tyrrell D.L.J., Schang L.M. Rigid amphipathic fusion inhibitors, small molecule antiviral compounds against enveloped viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2010**, 107, No. 40, 17339–17344 (2010).

## ТЕЗИСЫ КОНФЕРЕНЦИЙ И СИМПОЗИУМОВ

1. Prokhorenko I.A., **Korshun V.A.**, Gontarev S.V., Malakhov A.D., Berlin Y.A. Nile red, a dye for efficient oligonucleotide labelling. Third International Symposium on Bioorganic Chemistry. Abstracts. Dagomys, Russia, **1995**, 100.
2. **Korshun V.A.**, Prokhorenko I.A., Gontarev S.V., Skorobogatij M.V., Balakin K.V., Manasova E.V., Malakhov A.D., Berlin Y.A. New pyrene derivatives for fluorescent labeling of oligonucleotides. XII International Roundtable “Nucleosides, Nucleotides and their Biological Applications”. Abstracts. La Jolla, CA, USA, **1996**, 158.
3. **Коршун В.А.**, Малахов А.Д., Гонтарев С.В., Прохоренко И.А., Берлин Ю.А. Носитель для автоматизированного синтеза олигонуклеотидов, меченных порфирином по 3'-концевому фосфату. Юбилейная научная сессия, посвященная 100-летию со дня рождения профессора Н.А. Преображенского. Тезисы докладов. Москва, **1996**, 94–95.
4. Прохоренко И.А., Балакин К.В., Малеев Г.В., **Коршун В.А.**, Берлин Ю.А. Новое активированное производное пиренового бифлуорофора – синтез и использование для введения в олигонуклеотиды метки с эксимерной флуоресценцией. Юбилейная научная сессия, посвященная 100-летию со дня рождения профессора Н.А. Преображенского. Тезисы докладов. Москва, **1996**, 96–97.
5. **Коршун В.А.**, Манасова Е.В., Малахов А.Д., Балакин К.В., Берлин Ю.А. Синтез новых производных пирена для меченения олигонуклеотидов. Юбилейная научная сессия, посвященная 100-летию со дня рождения профессора Н.А. Преображенского. Тезисы докладов. Москва, **1996**, 98–99.
6. **Korshun V.A.**, Manasova E.V., Balakin K.V., Malakhov A.D., Berlin Y.A. New fluorescent nucleoside derivatives – 5-alkynylated 2'-deoxyuridines. International Conference “Nucleic Acids and Related Macromolecules: Synthesis, Structure, Function and Applications”. Abstracts. Ulm, Germany, **1997**, P61.
7. Манасова Е.В., **Коршун В.А.**, Кадуцкий А.П., Кожич Д.Т. Нуклеозидные производные 2-фенилбензоксазола. Українська конференція “Хімія азотвмісних гетероциклів”. Тези доповідей. Харків, **1997**, 152.

8. **Korshun V.A.**, Berlin Y.A. Fluorescent labels in nucleic acids research. XIII International Round Table "Nucleosides, Nucleotides and their Biological Applications". Abstracts. Montpellier, France, **1998**, Poster 232.
9. **Коршун В.А.**, Балакин К.В., Берлин Ю.А. Флуоресцентные метки в структурных исследованиях нуклеиновых кислот. XVI Менделеевский съезд по общей и прикладной химии. Рефераты докладов и сообщений № 4: Химия живого. Москва, **1998**, 84–85.
10. **Коршун В.А.**, Берлин Ю.А. Флуоресцентные метки в исследовании нуклеиновых кислот. IV Чтения, посвященные памяти академика Ю.А. Овчинникова. Тезисы докладов. Москва–Пушино, **1998**, 34.
11. Balakin K.V., **Korshun V.A.**, Perepelov A.V., Berlin Y.A. New fluorescent DNA probes. The Fifth World Congress on Biosensors. Abstracts. Berlin, Germany, **1998**, 108.
12. Malakhov A.D., Kozhich D.T., Gontarev S.V., Malakhova E.V., Grechishnikova I.V., Skorobogatyi M.V., Prokhorenko I.A., Stetsenko D.S., **Korshun V.A.**, Berlin Y.A. 1-(Phenylethynyl)pyrene and 9,10-bis(phenylethynyl)anthracene, useful luminescent dyes for DNA labeling. 11th European Symposium on Organic Chemistry. Abstracts. Göteborg, Sweden, **1999**, P88.
13. Малахов А.Д., Малахова Е.В., **Коршун В.А.**, Берлин Ю.А. Олигонуклеотиды, содержащие бензоксазолитолановые и пиренилэтинилфенильные псевдонуклеозидные звенья в качестве донора и акцептора энергии флуоресценции. Школа-конференция «Горизонты физико-химической биологии». Том 1. Тезисы стендовых сообщений. Пушино, **2000**, 92–93.
14. Prokhorenko I.A., Kuznitsova S.V., **Korshun V.A.** A new fluorescent nucleoside analogue for synthesis of oligonucleotide probes. International Conference "Trends in Nucleic Acid Chemistry". Abstracts. Moscow, Russia, **2000**, 10.
15. Malakhov A.D., Prokhorenko I.A., Skorobogatyi M.V., **Korshun V.A.** 1-(Phenylethynyl)pyrene and 9,10-bis(phenylethynyl)anthracene as useful luminescent dyes for DNA study. International Conference "Trends in Nucleic Acid Chemistry". Abstracts. Moscow, Russia, **2000**, 18.
16. Малахов А.Д., **Коршун В.А.**, Берлин Ю.А. 9,10-Бис(фенилэтинил)антрацен и 1-(фенилэтинил)пирен в качестве донора и акцептора энергии флуоресценции в изучении нуклеиновых кислот. V Чтения, посвященные памяти академика Ю.А. Овчинникова «Биоорганика-2000». Тезисы докладов. Москва–Пушино, **2000**, 25.
17. Malakhov A.D., **Korshun V.A.**, Berlin Y.A. Fluorescent oligonucleotide probes based on 9,10-bis(phenylethynyl)anthracene, 1-phenylethynylpyrene, and *p*-(2-benzoxazolyl)tolane: synthesis and functioning. 7<sup>th</sup> Conference on Methods and Applications of Fluorescence. Abstracts. Amsterdam, Netherlands, **2001**, P126.
18. Малахов А.Д., Прохоренко И.А., Скоробогатый М.В., Дюбанкова Н.Н., **Коршун В.А.** Синтез флуоресцентных нуклеозидов и их аналогов в качестве инструментов исследования нуклеиновых кислот. Конференция "От современной фундаментальной биологии к новым наукоемким технологиям". Труды. Пушино, **2001**, 75.
19. Дюбанкова Н.Н., Скоробогатый М.В., Пчелинцева А.А., Степанова И.А., Прохоренко И.А., Виноградова Л.А., Малахов А.Д., Берлин Ю.А., **Коршун В.А.** Модифицированные нуклеозиды и псевдонуклеозиды в синтезе люминесцентных производных олигонуклеотидов. VI Чтения, посвященные памяти академика Ю.А. Овчинникова. Тезисы докладов. Москва–Пушино, **2002**, 24.
20. Скоробогатый М.В., Пчелинцева А.А., Манасова Е.В., Андропова В.Л., Галегов Г.А., **Коршун В.А.** 5-Арилэтинил-2'-дезоксуридины – новый класс противовирусных нуклеозидов. XV Зимняя международная молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии". Тезисы докладов и стендовых сообщений. Москва, **2003**, 10.
21. Дюбанкова Н.Н., Малахов А.Д., **Коршун В.А.** Новый пиреновый амидофосфит на основе арабиноуридина. XV Зимняя международная молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии". Тезисы докладов и стендовых сообщений. Москва, **2003**, 34.
22. Дюбанкова Н.Н., Малахов А.Д., Стеценко Д.А., Гейт М.Дж., **Коршун В.А.** Новые пиреновые гомохиральные секопсевдонуклеозиды. XV Зимняя международная молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии". Тезисы докладов и стендовых сообщений. Москва, **2003**, 35.
23. Пчелинцева А.А., Скоробогатый М.В., Прохоренко И.А., **Коршун В.А.** Метод мечения олигонуклеотидов периленовым флуорофором. XV Зимняя международная молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии". Тезисы докладов и стендовых сообщений. Москва, **2003**, 36.
24. Дюбанкова Н.Н., Малахов А.Д., Прохоренко И.А., **Коршун В.А.** Флуоресцентные нуклеозид-2'-карбаматы. XVII Менделеевский съезд по общей и прикладной химии. Тезисы докладов. Секция А: Достижения и перспективы химической науки. Казань, **2003**, 295.
25. Dioubankova N.N., Malakhov A.D., Stetsenko D.A., Gait M.J., **Korshun V.A.** ara-Uridine-2'-carbamates: new reagents for introduction of functional groups into the major groove of a DNA duplex. 5th Cambridge Symposium "Nucleic Acids Chemistry & Biology". Abstracts. Cambridge, UK, **2003**, P16.



26. Dioubankova N.N., Malakhov A.D., Stetsenko D.A., Gait M.J., **Korshun V.A.** Fluorescent uridine-2'-carbamate derivatives for DNA labeling. 5th Cambridge Symposium "Nucleic Acids Chemistry & Biology". Abstracts. Cambridge, UK, **2003**, P17.
27. Dioubankova N.N., Malakhov A.D., **Korshun V.A.**, Stetsenko D.A., Gait M.J. Versatile homochiral non-nucleoside reagents for oligonucleotide modification. 5th Cambridge Symposium "Nucleic Acids Chemistry & Biology". Abstracts. Cambridge, UK, **2003**, P54.
28. Prokhorenko I.A., Dioubankova N.N., **Korshun V.A.** Nile Red – far-visible fluorescent dye on nucleic acids. 5th Cambridge Symposium "Nucleic Acids Chemistry & Biology". Abstracts. Cambridge, UK, **2003**, P78.
29. Dioubankova N.N., Malakhov A.D., Stetsenko D.A., **Korshun V.A.**, Gait M.J. Non-nucleoside reagents for incorporation of catalytically active groups into oligonucleotides. International Conference "Targeting RNA: Artificial Ribonucleases, Conformational Traps and RNA Interference". Abstracts. Novosibirsk, Russia, **2003**, 23.
30. Andronova V., Skorobogaty M., Berlin Y., **Korshun V.**, Galegov A. Antiherpetic activity of some 5-arylethynyl derivatives of 2'-deoxyuridine in Vero cells. The Sixteenth International Conference on Antiviral Research. Savannah, Georgia, USA, 2003. *Antivir. Res.*, **2003**, 57, A62.
31. Dioubankova N.N., Stetsenko D.A., Malakhov A.D., **Korshun V.A.**, Gait M.J. Pyrene on acyclic scaffold as a universal nucleotide: neither hydrogen bonds nor ribose moiety are needed. 6<sup>th</sup> International Meeting on Recognition Studies in Nucleic Acids, NACON VI. Abstracts. Sheffield, UK, **2004**, 51.
32. Петрунина А.Л., Пчелинцева А.А., **Коршун В.А.**, Малахов А.Д., Скоробогатый М.В. Синтез новых 5-замещенных 2'-дезоксинуридинов, потенциальных противовирусных нуклеозидов. XVI Зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии". Тезисы докладов и стендовых сообщений. Москва, **2004**, 6.
33. Астахова И.В., Устинов А.В., Петрунина А.Л., Малахов А.Д., **Коршун В.А.**, Скоробогатый М.В. Необычные 5-арилэтинил-2'-дезоксинуридины. XVI Зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии". Тезисы докладов и стендовых сообщений. Москва, **2004**, 46.
34. Дюбанкова Н.Н., Малахов А.Д., **Коршун В.А.** Пиреновый эксимер для детекции точечных мутаций. XVI Зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии". Тезисы докладов и стендовых сообщений. Москва, **2004**, 48.
35. Козлова А.А., Малахов А.Д., Момыналиев К.Т., Прохоренко И.А., **Коршун В.А.** Применение 1-фенилэтинилпиренового псевдонуклеозида для конструирования эксимеробразующих ДНК-зондов. XVI Зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии". Тезисы докладов и стендовых сообщений. Москва, **2004**, 50.
36. Ustinov A.V., Petrunina A.L., Pchelintseva A.A., Astakhova I.V., Stepanova I.A., Malakhov A.D., Andronova V.L., Galegov G.A., **Korshun V.A.**, Skorobogatyj M.V. 2'-Deoxyuridines with bulky 5-substituents as potential anti-HSV compounds. XVI International Roundtable of International Society for Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids. Program and Abstracts. Minneapolis, MN, USA, **2004**, 172.
37. Skorobogatyj M.V., Pchelintseva A.A., Ustinov A.V., **Korshun V.A.**, Malakhov A.D. Dye-dye and dye-DNA interactions in modified duplexes. XVI International Roundtable of International Society for Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids. Program and Abstracts. Minneapolis, MN, USA, **2004**, 173.
38. Пчелинцева А.А., Устинов А.В., Скоробогатый М.В., Петрунина А.Л., Андропова В.Л., Галегов Г.А., **Коршун В.А.** Связь структуры и биологической активности: новые антивирусные соединения в ряду 5-арилэтинил-2'-дезоксинуридинов. XVII Зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии". Тезисы докладов и стендовых сообщений. Москва, **2005**, 61.
39. Устинов А.В., Астахова И.В., Квач М.В., Шманай В.В., Стеценко Д.А., Дюбанкова Н.Н., **Коршун В.А.**, Малахов А.Д. Молекулярный конструктор: расширение возможностей нанотехнологии нуклеиновых кислот. XVII Зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии". Тезисы докладов и стендовых сообщений. Москва, **2005**, 64.
40. Astakhova I.V., Malakhov A.D., Ustinov A.V., Dioubankova N.N., **Korshun V.A.** Excimer forming 1-, 2- and 4-phenylethynylpyrenes as fluorescent labels for DNA major groove. Nucleic Acid Chemical Biology (NACB) PhD Summer School "Novel Synthetic Nucleic Acids and the Targeting of Biologically Important RNAs". Abstracts. Odense, Denmark, **2005**, P-05.
41. Астахова И.В., Малахов А.Д., **Коршун В.А.** Эксимер 1-фенилэтинилпирена в большой бороздке ДНК. XVIII Зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии". Тезисы докладов и стендовых сообщений. Москва, **2006**, 56–57.
42. Устинов А.В., Квач М.В., Шманай В.В., **Коршун В.А.** Модифицированные олигонуклеотиды, содержащие этинильную группу: синтез и реакция 1,3-диполярного циклоприсоединения к азидам. XVIII Зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии". Тезисы докладов и стендовых сообщений. Москва, **2006**, 63.

43. Ustinov A., Dubnyakova V., **Korshun V.** Click chemistry on DNA: a versatile tool for nanotechnology and photonics. XVII International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids. Conference Book. Bern, Switzerland, **2006**, 103.
44. Skorobogatyi M., Kvach M., Zhilinskaya M., Yarmolinsky D., **Korshun V.**, Shmanai V. Through-stack energy transfer for SNP detection. XVII International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids. Conference Book. Bern, Switzerland, **2006**, 121.
45. Kvach M., Prokhorenko I., Ustinov A., Gontarev S., **Korshun V.**, Shmanai V. Reagents for selective conjugation of oligonucleotides. XVII International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids. Conference Book. Bern, Switzerland, **2006**, 137.
46. Valueva O., Korkach S., Astakhova I., Stepanova I., **Korshun V.**, Ustinov A. 5-Arylethynyl derivatives of 2'-deoxyuridine and *arabino*-uridine: synthesis and antiviral evaluation. The Nineteenth International Conference on Antiviral Research. San Juan, Puerto Rico, 2006. *Antivir. Res.*, **2006**, 70, A68.
47. Астахова И.В., Устинов А.В., Бондарев С.Л., Турбан А.А., Малахов А.Д., **Коршун В.А.** Фенилэтинилпирены как эксимеробразующие флуоресцентные метки для ДНК. Международная конференция "Физико-химическая биология", посвященная 80-летию академика Д.Г. Кнорре. Сборник трудов. Новосибирск, **2006**, 121.
48. Устинов А.В., Квач М.В., Дубнякова В.В., Прохоренко И.А., Шманай В.В., **Коршун В.А.** Реакция 1,3-диполярного циклоприсоединения в синтезе модифицированных олигонуклеотидов и ДНК-наноструктур. Международная конференция "Физико-химическая биология", посвященная 80-летию академика Д.Г. Кнорре. Сборник трудов. Новосибирск, **2006**, 177.
49. Dubnyakova V.V., Ustinov A.V., **Korshun V.A.** Branching and joining by click chemistry: where bioconjugation meets nanotechnology. Nucleic Acid Chemical Biology (NACB) PhD Summer School "Novel Synthetic Nucleic Acids and the Targeting of Biologically Important RNAs". Abstracts. Odense, Denmark, **2007**, P-17.
50. Madsen A.S., Lindegaard D., Astakhova I.V., Malakhov A.D., Babu B.R., **Korshun V.A.**, Wengel J. Pyrene-perylene as a FRET pair coupled to the N2'-amino-LNA. Nucleic Acid Chemical Biology (NACB) PhD Summer School "Novel Synthetic Nucleic Acids and the Targeting of Biologically Important RNAs". Abstracts. Odense, Denmark, **2007**, P-45.
51. Korkach S.V., Valueva O.A., Doubniakova V.V., **Korshun V.A.**, Ustinov A.V. Pyrimidine nucleosides containing 5-substituent: synthesis and antiviral activity. The Twentieth International Conference on Antiviral Research. Palm Springs, CA, USA, 2007. *Antivir. Res.*, **2007**, 74, No. 3, A73.
52. St. Vincent M., Korkach S., Valueva O., **Korshun V.**, Ustinov A., Schang L. Nucleoside fusion inhibitors. The Twentieth International Conference on Antiviral Research. Palm Springs, CA, USA, 2007. *Antivir. Res.*, **2007**, 74, No. 3, A87.
53. Astakhova I.V., Zatsepin T.S., **Korshun V.A.** Modified oligonucleotides with phenylethynylpyrenes as fluorescent probes. 3<sup>rd</sup> Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutic Society. Abstracts. Berlin, Germany, **2007**, 269–270.
54. Astakhova I.V., Malakhov A.D., **Korshun V.A.** (Phenylethynyl)pyrenes as fluorescent probes for DNA. Træf for Organisk Kemi Studerende (TOKS) IX. Copenhagen's Lyngby, Denmark, **2007**, P-13.
55. Astakhova I., Malakhov A., Ustinov A., Bondarev S., **Korshun V.**, Wengel J. Novel multilabeled oligonucleotides containing 1-phenylethynylpyrene *ara*-2'-uridine-carbamate and LNA: synthesis and photochemical properties. International Symposium on Advances in Synthetic and Medicinal Chemistry (ASMC 07). St. Petersburg, Russia, **2007**, T29.
56. Madsen A., Lindegaard D., Astakhova I.V., Malakhov A.D., Babu B.R., **Korshun V.A.**, Wengel J. Pyrene-perylene as a FRET pair coupled to the N2'-functionality of 2'-amino-LNA. 234th ACS National Meeting. Abstracts. Boston, MA, United States, **2007**, 336.
57. Дубнякова В.В., Устинов А.В., **Коршун В.А.** Самосборка биоконъюгатов органических азидов с ДНК с образованием наноструктур. XX Зимняя международная молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии". Тезисы докладов и стендовых сообщений. Москва, **2008**, 86.
58. Храмышев С.А., Шанг Л.М., **Коршун В.А.**, Устинов А.В. Противовирусные нуклеозиды с нуклеозидным механизмом действия: ингибирование слияния оболочки вириона и клеточной мембраны. XX Зимняя международная молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии". Тезисы докладов и стендовых сообщений. Москва, **2008**, 93.
59. Квач М.В., Устинов А.В., Цыбульский Д.А., **Коршун В.А.**, Шманай В.В. Флуоресцентные реагенты для мечения биополимеров. IV Съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов. Тезисы докладов. Новосибирск, **2008**, 482 (с. 277).
60. Устинов А.В., Дубнякова В.В., Квач М.В., Шманай В.В., **Коршун В.А.** Модифицировать или не модифицировать? ДНК-наноструктуры, содержащие необычные точки разветвления. IV Съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов. Тезисы докладов. Новосибирск, **2008**, 544 (с. 312).

61. Khramyshev S., Valueva O., **Korshun V.**, Ustinov A. Synthesis of structural analogues of dUY11, a potent amphipathic fusion inhibitor nucleoside. The Twenty-First International Conference on Antiviral Research. Montreal, Quebec, Canada, 2008. *Antivir. Res.*, **2008**, 78, No. 2, A42.
62. St. Vincent M., **Korshun V.**, Ustinov A., Schang L. Herpes simplex virus type 2 exposed to rigid amphipathic fusion inhibitors (RAFIs) are not infectious in a mouse vaginal model. The Twenty-First International Conference on Antiviral Research. Montreal, Quebec, Canada, 2008. *Antivir. Res.*, **2008**, 78, No. 2, A64–A65.
63. Устинов А.В., Дубнякова В.В., **Коршун В.А.** Синтез и гибридизация ДНК-структур, получаемых конъюгацией алкинированных олигонуклеотидов с органическими полиазидами. Конференция «Химическая биология – фундаментальные проблемы бионанотехнологии». Сборник трудов. Новосибирск, **2009**, 56.
64. St. Vincent M., Ustinov A., Barsby N., Joyce M., Tyrrell L., Epanand R., **Korshun V.**, Schang L. dUY11, a rigid amphipathic fusion inhibitor, inhibits HCV infectivity by modulating membrane curvature. The Twenty-Second International Conference on Antiviral Research. Miami Beach, Florida, USA, 2009. *Antivir. Res.*, **2009**, 82, No. 3, A21.
65. Astakhova I.V., **Korshun V.A.**, Wengel J. SNP analysis of HIV protease RNA at drug resistance site 2332-2354 using short fluorescent DNA/LNA probes. XIX International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids. Conference Book. Lyon, France, **2010**, 605–606.
66. Colpitts C.C., Ustinov A.V., **Korshun V.A.**, Schang L.M. Rigid amphipathic fusion inhibitors (RAFIs) inhibit infectivity of enveloped viruses by targeting envelope lipids to prevent fusion with cellular membranes. The Twenty-Fourth International Conference on Antiviral Research. Sofia, Bulgaria, 2011. *Antivir. Res.*, **2011**, 90, No. 2, A30–A31.