

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Государственный научный центр Российской Федерации  
Институт биоорганической химии  
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук

На правах рукописи

**Брылёв Владимир Анатольевич**

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

Специальность 1.4.9 – биоорганическая химия

Диссертация на соискание учёной степени

кандидата химических наук

Научный руководитель  
д.х.н. Владимир Аркадьевич Коршун

Москва – 2024

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ.....	2
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
ВВЕДЕНИЕ.....	5
<b>Глава 1.</b> Получение и применение разветвлённых олигонуклеотидных конъюгатов (обзор литературы)	
1.1. <i>Разветвляющие реагенты для использования в твердофазном автоматическом олигонуклеотидном синтезе</i> .....	10
1.2. <i>Синтез олигонуклеотидов, содержащих разветвлённую N-ацетил-галактозаминовую модификацию</i> .....	18
1.3. <i>Синтез разветвлённых олигонуклеотидных конъюгатов с использованием биоортогональных реакций</i> .....	22
1.4. <i>Разветвлённые конъюгаты аптамеров</i> .....	29
<b>Глава 2.</b> Разработка подходов к синтезу разветвлённых олигонуклеотидных конъюгатов (результаты и обсуждение)	
2.1. <i>Разветвляющие реагенты на основе пентаэритрита</i> .....	32
2.2. <i>Синтез разветвлённых олигонуклеотид-олигонуклеотидных конъюгатов</i> .....	33
2.3. <i>Гомогенные олигонуклеотидные конъюгаты из диазида и сборка простой наноструктуры на их основе</i> .....	38
2.4. <i>Наномономеры для сборки динамических ДНК-наноструктур</i> .....	46
2.5. <i>Олигонуклеотидные конъюгаты, содержащие разветвлённые кластеры N-ацетилгалактозамина</i> .....	55
2.6. <i>Синтез разветвлённых конъюгатов EGFR-специфического аптамера, содержащих ферментативно-отщепляемый MMAE</i> .....	59
<b>Глава 3.</b> ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ (материалы и методы)	
3.1. <i>Общие методы</i> .....	66
3.2. <i>Синтез низкомолекулярных соединений</i> .....	67
3.3. <i>Синтез разветвлённых олигонуклеотидных конъюгатов из полиазидов</i> .....	73
3.4. <i>Конъюгация красителей Су3 и Су5</i> .....	74
3.5. <i>Синтез V-образных олигонуклеотидных конъюгатов</i> .....	74
3.6. <i>Дискретные ДНК-наноструктуры из гомо V-образных блоков</i> .....	76
3.7. <i>Синтез несимметричных V-образных блоков</i> .....	77
3.8. <i>Получение нанономеров NM1 и NM2</i> .....	77
3.9. <i>Молекулярное моделирование олигонуклеотидных конъюгатов</i> .....	78
3.10. <i>Атомно-силовая микроскопия</i> .....	78
3.11. <i>Синтез олигонуклеотидных конъюгатов с кластерами GalNAc</i> .....	79
3.12. <i>Синтез конъюгатов аптамеров с MMAE</i> .....	79
ВЫВОДЫ .....	81
БЛАГОДАРНОСТИ .....	82
ЛИТЕРАТУРА .....	83

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

AA-CPG	– аминоалкил-модифицированное стекло с контролируемой пористостью;
ADC	– конъюгат антитело–препарат (antibody–drug conjugate);
Alloc	– аллилоксикарбонил;
AOC	– конъюгат антитело–олигонуклеотид (antibody–oligonucleotide conjugate);
ASGPR	– асиалогликопротеиновый рецептор;
ASO	– антисмысловый олигонуклеотид;
BMS	– боран-диметилсульфид;
Bz	– бензоил;
CEP	– цианэтоксидиизопропиламинофосфинил;
CPG	– подложка на основе стекла с контролируемой пористостью;
CuAAC	– медь-катализируемое циклоприсоединение азидов и алкинов;
DCM	– дихлорметан (метиленхлорид);
DMF	– диметилформамид;
DMSO	– диметилсульфоксид;
Dmt	– 4,4'-диметокситритил;
EDTA	– этилендиаминтетраацетат;
EGFR	– рецептор эпидермального фактора роста;
EN	– этилендиамин;
Et	– этил;
ESI	– ионизация электрораспылением;
Fmoc	– 9-флуоренилметилоксикарбонил;
GalNAc	– N-ацетилгалактозамин;
HRMS	– масс-спектрометрия высокого разрешения;
LCAA-CPG	– подложка CPG, модифицированная длинноцепочечным амином;
Lev	– левулинил;
MMAE	– монометилауристин;
Me	– метил;
MES	– 2-(N-морфолино)этансульфонат;
Mmt	– 4-метокситритил (монометокситритил);
Ms	– мезил (метилсульфонил);
PABC	– <i>para</i> -аминбензилкарбамат;
PBS	– фосфатно-солевой буфер;
Pht	– фталимидо-группа;
SARS-CoV-2	– коронавирус тип 2;

SPAAC	– промотируемое напряжением цикла циклоприсоединение азидов и алкинов;
siRNA	– малая интерферирующая РНК;
ТАЕ	– трис-ацетат + EDTA;
ТВАН	– гидроксид тетрабутиламмония;
TBDMS	– <i>трет</i> -бутилдиметилсилил;
TBDPS	– <i>трет</i> -бутилдифенилсилил;
ТВТА	– трис(1-бензил-1,2,3-триазол-4-ил-метил)амин;
THF	– тетрагидрофуран;
TMEDA	– тетраметилэтилендиамин;
АСМ	– атомно-силовая микроскопия;
ВОПГ	– высокоориентированный пиролитический графит;
ВЭЖХ	– высокоэффективная жидкостная хроматография;
ВЭЖХ-МС	– высокоэффективная жидкостная хроматография–масс-спектрометрия;
ГМ	– графитовый модификатор;
ГЭБ	– гематоэнцефалический барьер;
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота;
ИК	– инфракрасный (спектр);
ОДН	– олигодезоксирибонуклеотид;
ПААГ	– полиакриламидный гель;
ПЦР	– полимеразная цепная реакция;
РНК	– рибонуклеиновая кислота;
ТСХ	– тонкослойная хроматография;
УФ	– ультрафиолетовый;
ЯМР	– ядерный магнитный резонанс.

## ВВЕДЕНИЕ

Нуклеиновые кислоты, ДНК и РНК, являются, наряду с белками, важнейшими биополимерами. В живых организмах они выполняют разнообразные функции, в первую очередь, играют ключевую роль в хранении и передаче наследственной информации. Также нуклеиновые кислоты выполняют структурные и транспортные функции, участвуют в регуляции различных биохимических процессов.

Строение нуклеозидов и нуклеотидов было установлено в первой половине XX века. В начале 1950х гг Дэн Браун и Александер Тодд показали 5'-3'-связанность нуклеозидов в РНК [1], в это же время Эрвин Чаргафф сформулировал правило о соотношении азотистых оснований в ДНК [2], а со знаменитой работы Джеймса Уотсона и Френсиса Крика [3] началась эра структурной биологии нуклеиновых кислот.

Последующие открытия кодирования в ДНК аминокислотных последовательностей белков и механизмов репликации, транскрипции и трансляции, а также эндонуклеаз рестрикции, привели к возникновению генетической инженерии и сделали насущными потребностями секвенирование и химический синтез целевых последовательностей нуклеиновых кислот. Эти потребности привели к бурному развитию химии нуклеиновых кислот в 1960–1980 гг; секвенирование и олигонуклеотидный синтез были реализованы в автоматизированном варианте. Хар Гобинд Корана в 1960х гг начал работы по олигонуклеотидному синтезу в растворе, а в 1980х гг усилиями Роберта Летзингера, Марвина Карузера, Марка Матуччи, Сержа Бокажа и Хуберта Кёстера синтез олигомеров ДНК стал рутинной процедурой [4]; основные химические принципы созданного ими твердофазного амидофосфитного (фосфамидитного) метода наращивания цепи массово используются до сих пор [5–7].

С 1990х гг активно развиваются методы получения химически модифицированных олигонуклеотидов. Модификации вводят с помощью модифицированных стартовых подложек и фосфамидитных реагентов в процессе автоматического олигонуклеотидного синтеза [8–10]. Если модификация несовместима с химией синтетического цикла или финального деблокирования, то применяют ступенчатую модификацию: введение функциональной группы в синтезаторе и дальнейшую постфункционализацию в растворе [11]. Арсенал реакций для постфункционализации значительно расширился в результате бурного развития в последние 25 лет концепции так называемых биоортогональных реакций, т.е. реакций, которые не затрагивают обычный набор функциональных групп биомолекул [12–19]. В целом, химия фосфамидитного цикла оказалась весьма удачной, что позволяет широко применять её в различных областях, например, для синтеза полимерных биоматериалов для регенеративной медицины [20].

Важными стимулами развития химии нуклеиновых кислот явились исследования минорных нуклеозидов РНК [21–25], эпигенетические исследования [26–28], исследования повреждения и репарации нуклеиновых кислот [29–32], исследования функционирования и ингибирования поли(аденозиндифосфатрибозы)полимеразы [33,34].

Традиционные области применения химически модифицированных олигонуклеотидов следующие: флуоресцентные производные олигонуклеотидов применяются как ДНК-зонды в ПЦР-диагностике в режиме реального времени [35–39], иммобилизованные олигонуклеотиды используются в микрочипах [40–43], на конъюгатах построены ДНК-кодируемые библиотеки в комбинаторной медицинской химии [44–53].

Более 30 лет активно развивается технология *НК-аптамеров*, олигонуклеотидов, способных специфично связываться с различными молекулярными мишенями (за счёт формирования вторичных и третичных структур). Аптамеры создают с помощью селекции *in vitro* и применяют в основном в виде конъюгатов или иммобилизованные на носители, что предопределило приложение к ним всего арсенала методов химической модификации олигонуклеотидов [54–67]. Аптамеры по своей способности прочно связываться с мишенями отчасти подобны антителам, но, в отличие от них, имеют олигонуклеотидную природу и гораздо меньший размер/массу (обычно менее 20 кДа против примерно 150 кДа для полноразмерных иммуноглобулинов G). Аптамеры могут быть получены к весьма малым мишеням, вплоть до ионов металлов, что расширяет возможности их применения в различных областях. Аптамеры используются для диагностики, анализа, как сенсоры, в качестве средств направленной доставки терапевтических препаратов и других терапевтических приложений, а также в качестве инструментов исследования в структурной и молекулярной биологии.

Следующей обширной областью применения модифицированных олигонуклеотидов является их применение *в качестве лекарств*. Эта область весьма динамично развивается, и в отношении её перспектив возлагаются большие надежды [7,68–72]. По состоянию на март 2024 г имеется 20 одобренных/коммерческих терапевтических олигонуклеотидных препаратов [73], каждый из которых является модифицированным олигонуклеотидом. Большой интерес к конъюгатам олигонуклеотидов с антителами (АОС) связан с потенциальным разнообразием их областей применения [74]. Конъюгаты антитело–ДНК применяют как инструмент в иммуно-ПЦР – чувствительном методе анализа, основанном на связывании антитела с антигеном и реалтайм-ПЦР детекции ДНК-матрицы [75–78]. Однако, самые привлекательные перспективы связывают с использованием АОС в качестве терапевтических агентов [79–81], например, антитела могут служить для доставки малых интерферирующих РНК (siRNA), антисмысловых олигонуклеотидов

(ASOs) и морфолиновых олигонуклеотидов (PMOs) [82]. В настоящее время несколько АОС находятся на различных стадиях доклинических и клинических исследований [83,84].

Наконец, важным потребителем модифицированных олигонуклеотидов является *(Д)НК-нанотехнология*. Способность к гибридизации – фундаментальное свойство нуклеиновых кислот. Постулированное Уотсоном и Криком спаривание оснований обладает исключительной специфичностью. Меж- и внутримолекулярная гибридизация ДНК и РНК в природе позволила предположить их применение для создания самособирающихся структур. Более четырех десятилетий назад, черпая вдохновение в структурах природных репликативных сочленений ДНК, Надриан Симэн постулировал применимость "миграционно неподвижных развязок" на основе структур Холлидея с несимметричными последовательностями для создания протяженных наноструктур ДНК [85], положив тем самым начало эре нанотехнологий нуклеиновых кислот. Для ДНК-наноструктур (или ДНК-оригами) [86,87] декларируются разнообразные применения: самосборка различных объектов, например куб, кольца Борромео, ящик с крышкой и др. [88]; 2D-объекты на основе двойных кроссоверов, ДНК-плоскости, 3D-кристаллы [89,90], наномеханические устройства и динамические реконфигурируемые материалы [91–94], нанобиосенсоры [95–97], нанообъекты для металлизации [98,99], структуры для ДНК-компьютинга [100], ДНК-гидрогели и ДНК-пористые материалы [101,102], функциональные нанопоры [103], синтетические мембранные каналы [104], ДНК-белковые гибридные структуры [105,106], ДНК-метаструктуры [107], ДНК-хранилища данных [108–111], межклеточные интерфейсы [112,113], ДНК-наноструктуры для доставки лекарств [114,115] и терапии опухолевых заболеваний [33,116,117], инструменты для воздействия на иммунную систему [118] и т.д. Большинство ДНК-наноструктур собирают гибридизацией немодифицированных олигонуклеотидов, используя для разветвления сочленения Холлидея [119–121]. Но модифицированные олигонуклеотиды с функциональными группами и биоортогональные реакции дают и в этой области новые возможности.

Области исследования аптамеров, олигонуклеотидных терапевтических препаратов и НК-нанотехнология взаимно пересекаются; прогресс в области описывают многие десятки и сотни обзоров. Поэтому было достаточно сложно выделить для обобщения в литературном обзоре какой-то свежий и оригинальный аспект применения химически модифицированных олигонуклеотидов. Мы решили коротко рассмотреть применение разветвляющих реагентов и биоортогональных реакций для синтеза разветвленных

олигонуклеотидных конъюгатов, а также применение последних, преимущественно в вышеуказанных актуальных областях, уделяя больше внимания работам последних лет.

В настоящем исследовании предпринята попытка разработать с помощью биоортогональных реакций удобные методы получения разветвленных олигонуклеотидных конъюгатов, потенциально применимых для различных целей – в качестве потенциальных терапевтических агентов, диагностических инструментов, или в качестве элементов динамических ДНК-наноструктур.

Работа выполнена в Лаборатории молекулярного дизайна и синтеза (ранее Лаборатория органического синтеза и Группа биоконъюгации) Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (ИБХ РАН) при взаимодействии с коллегами из других подразделений Института, а также в сотрудничестве с коллегами из ФГАУ «НМИЦ нейрохирургии им. ак. Н.Н. Бурденко» Минздрава России, МГУ им. М.В. Ломоносова, Сколковского института науки и технологий, Института физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси (Минск), Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины ФМБА.

*Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации*

Основные результаты получены лично автором или при его непосредственном участии под руководством д.х.н. зав. лаб. молекулярного дизайна и синтеза Коршуна В.А. и при взаимодействии с коллегами по Лаборатории. Личный вклад автора заключается в непосредственном участии в выборе направления научной работы, разработке цели и задач исследования по теме диссертационной работы. Автор разрабатывал методы синтеза как низкомолекулярных соединений, так и олигонуклеотидных конъюгатов, проводил выделение и очистку конъюгатов, анализировал данные по физико-химическим характеристикам веществ (интерпретировал масс-спектры, спектры ЯМР), проводил спектральные исследования полученных соединений (спектры поглощения и флуоресценции), а также участвовал в написании и подготовке к публикации статей и тезисов докладов на научных конференциях по результатам исследования. Кроме результатов автора, в работе были использованы экспериментальные данные, полученные в других лабораториях и в рамках научного сотрудничества с другими организациями: ФГАУ «НМИЦ нейрохирургии им. ак. Н.Н. Бурденко» Минздрава России (Г.В. Павлова, Н.С. Самойленкова и др.), Сколковским институтом науки и технологий (Т.С. Зацепин и др.), Институтом физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси (В.В. Шманай, Ю.В. Мартыненко-Макаев и др.), Федеральным научно-клиническим центром физико-химической медицины ФМБА (Д.В. Клинов, В.Б. Цветков,



Н.А. Баринов), МГУ им. М.В. Ломоносова (Д.А. Гвоздев и др.), ИБХ РАН (Д.Ю. Рязанцев и др.).

Список статей, опубликованных в рецензируемых изданиях по теме диссертации:

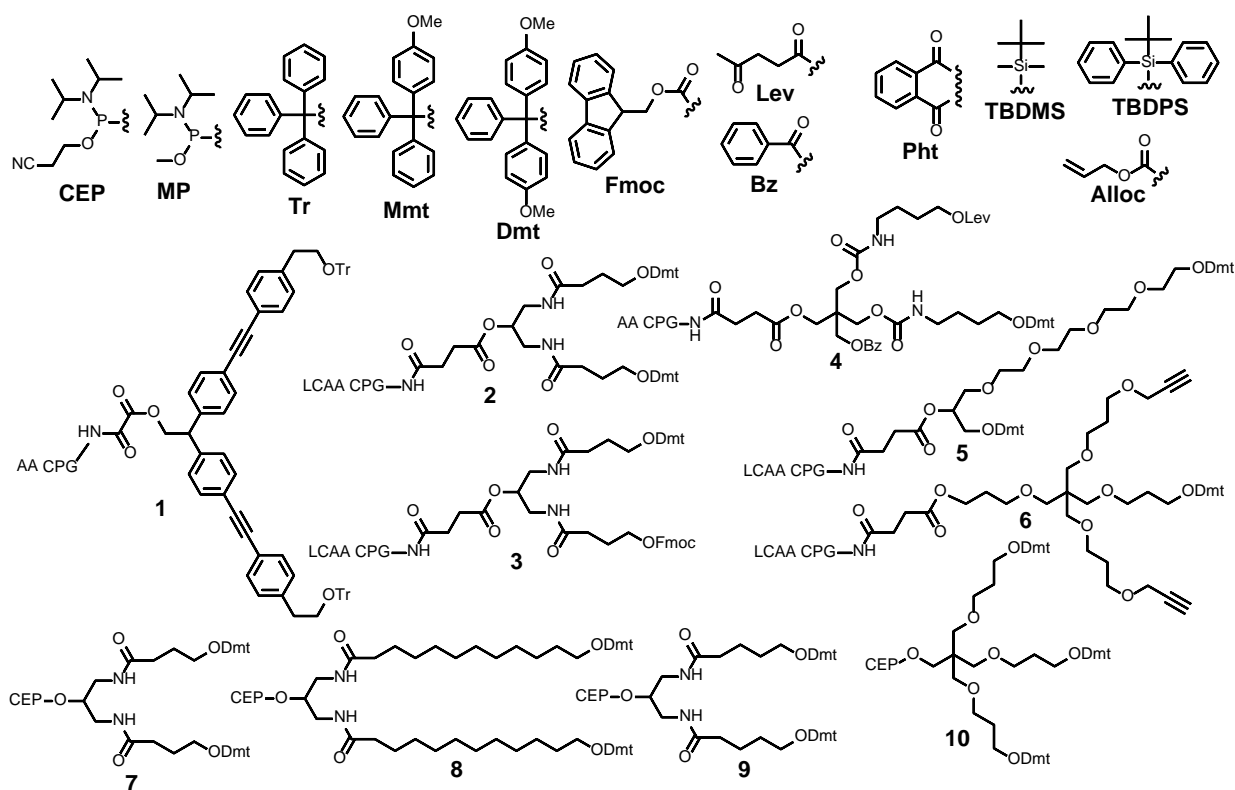
1. **Брылёв В.А.**, Лысенко И.Л., Кокин Е.А., Мартыненко-Макаев Ю.В., Рязанцев Д.Ю., Шманай В.В., Коршун В.А. Олигонуклеотидные зонды типа «молекулярный маяк» с флуоресцеиновым бифлуорофором. *Биоорг. химия*, **47** (3), 365–372 (2021). <https://doi.org/10.31857/S0132342321030052>  
Engl. transl.: **Brylev V.A.**, Lysenko I.L., Kokin E.A., Martynenko-Makaev Y.V., Ryazantsev D.Y., Shmanai V.V., Korshun V.A. Molecular beacon DNA probes with fluorescein bifluorophore. *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **47** (3), 734–740 (2021). <https://doi.org/10.1134/S1068162021030055>
2. **Brylev V.A.**, Ustinov A.V., Tsvetkov V.B., Barinov N.A., Aparin I.O., Sapozhnikova K.A., Berlina Y.Y., Kokin E.A., Klinov D.V., Zatsepin T.S., Korshun V.A. Toehold-mediated selective assembly of compact discrete DNA nanostructures. *Langmuir*, **36** (49), 15119–15127 (2020). <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c02696>
3. Sapozhnikova K.A., Slesarchuk N.A., Orlov A.A., Khvatov E.V., Radchenko E.V., Chistov A.A., Ustinov A.V., Palyulin V.A., Kozlovskaya L.I., Osolodkin D.I., Korshun V.A., **Brylev V.A.** Ramified derivatives of 5-(perylene-3-ylethynyl) uracil-1-acetic acid and their antiviral properties. *RSC Adv.*, **9** (45), 26014–26023 (2019). <https://doi.org/10.1039/C9RA06313G>
4. Farzan V.M., Ulashchik E.A., Martynenko-Makaev Y.V., Kvach M.V., Aparin I.O., **Brylev V.A.**, Prikazchikova T.A., Maklakova S.Y., Majouga A.G., Ustinov A.V., Shipulin G.A., Shmanai V.V., Korshun V.A., Zatsepin T.S. Automated solid-phase click synthesis of oligonucleotide conjugates: from small molecules to diverse *N*-acetylgalactosamine clusters. *Bioconjugate Chem.*, **28** (10), 2599–2607 (2017). <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00462>
5. Ponomarenko A.I., **Brylev V.A.**, Sapozhnikova K.A., Ustinov A.V., Prokhorenko I.A., Zatsepin T.S., Korshun V.A. Tetrahedral DNA conjugates from pentaerythritol-based polyazides. *Tetrahedron*, **72** (19), 2386–2391 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.tet.2016.03.051>
6. Ponomarenko A.I., **Brylev V.A.**, Nozhevnikova E.V., Korshun V.A. Recent advances in self-assembled fluorescent DNA structures and probes. *Curr. Top. Med. Chem.*, **15** (13), 1162–1178 (2015). <https://doi.org/10.2174/1568026615666150330110131>

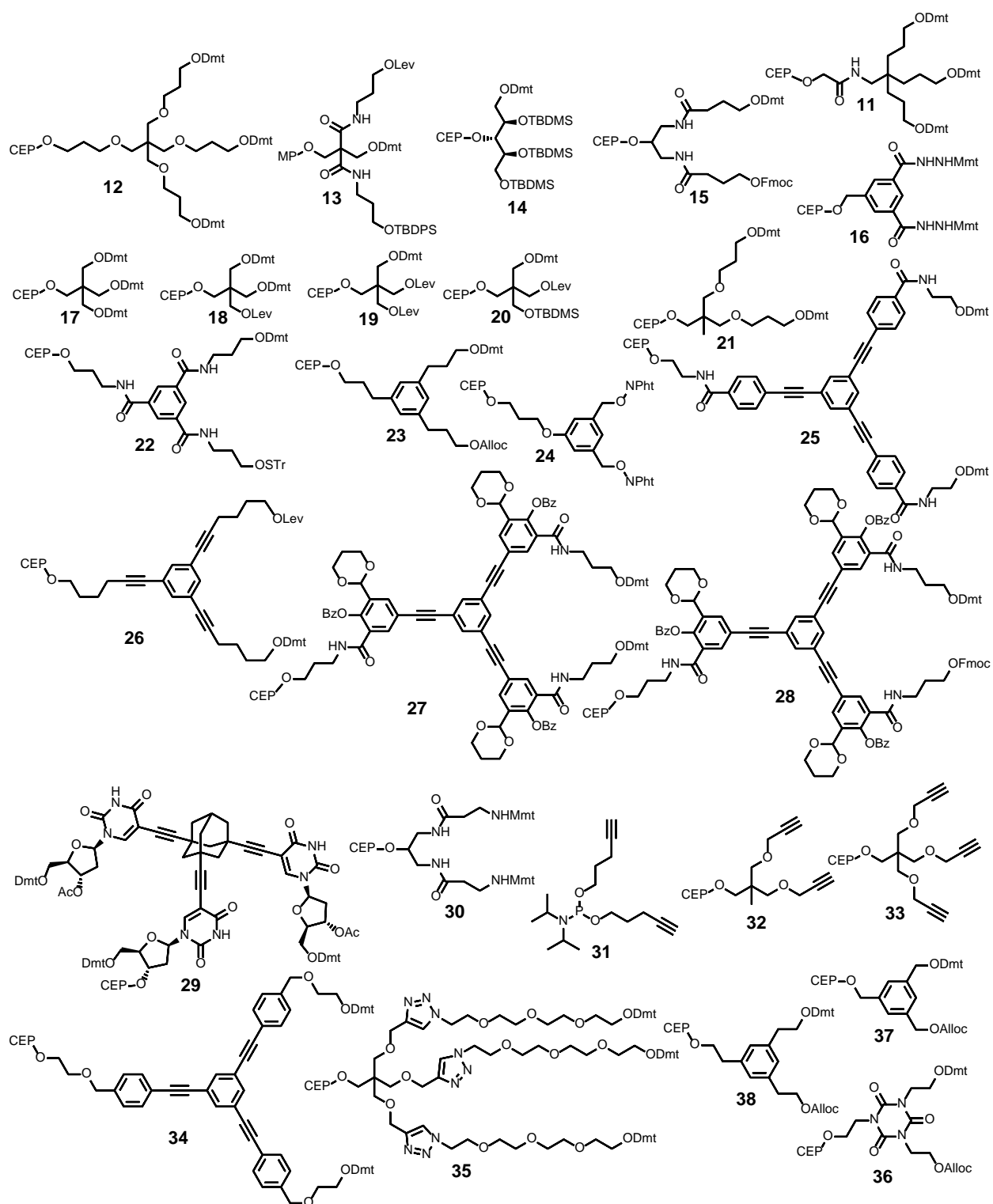
## Разветвленные олигонуклеотидные конъюгаты (обзор литературы)

### 1.1. Разветвляющие реагенты для использования в твердофазном автоматическом олигонуклеотидном синтезе

Синтетический цикл классического фосфамидитного олигонуклеотидного синтеза включает несколько стадий, в условиях которых устойчивы многие функциональные группы – в частности, алкиламиды, карбаматы, алкины и т.д. Это позволило получать разнообразные ненуклеозидные разветвляющие реагенты. Под разветвляющими мы понимаем такие реагенты, которые позволяют в синтезаторе получать олигонуклеотид-олигонуклеотидные конъюгаты или олигонуклеотиды, модифицированные двумя или более лигандами. Описано получение твердофазных носителей **1** [122], **2** [123], **3** [124], **4** [125], **5** [126], **6** [127], **7**, **8** [128], **9** [129], **10** [130–132], **11** [133], **12** [134], **13** [135], **14** [136], **15** [124], **16** [137], **17–20** [138], **21** [139], **22** [140,141], **23** [142], **24** [143], **25** [144], **26** [145], **27**, **28** [146,147], **29** [148], **30** [149], **31–33** [150], **34** [151], **35** [152], **36–38** [153] (Рис. 1).

Множественно использовали для синтеза разветвленных конъюгатов коммерчески доступные разветвители **9** [154–169], **10** [154,157,162,170–184,165,185,167–169] и **12** [166,186–192]. Оригинальный реагент **26** также использовался несколько раз для конструирования сетчатых структур [193–196].





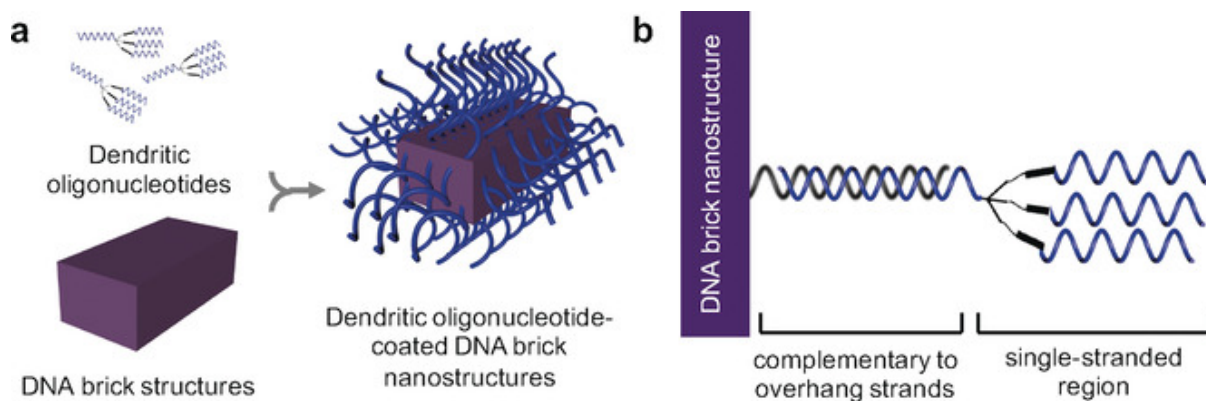
**Рис. 1.** Реагенты для синтеза разветвленных олигонуклеотидов в автоматическом синтезаторе.

Основная идея использования разветвляющих реагентов состоит в возможности ступенчатого синтеза различных последовательностей. Разветвляющие реагенты на основе фосфамидитов обладают рядом недостатков. Первым недостатком является одновременный синтез сразу нескольких последовательностей после точки ветвления, что приводит к образованию разветвленного продукта с несколькими одинаковыми олигонуклеотидами. Вторым недостатком является неизбежное внесение ошибок в виде

делений в последовательность олигонуклеотидов после точки разветвления, так как эффективность конденсации мономеров всегда меньше 100%, хотя и поддерживается достаточно высокой. При росте сразу нескольких цепей и при синтезе протяженных олигонуклеотидов вероятность образования делеции на одной из растущих цепей повышается. А очистка высокомолекулярных разветвленных олигонуклеотидов не позволяет отделить делетированные примеси.

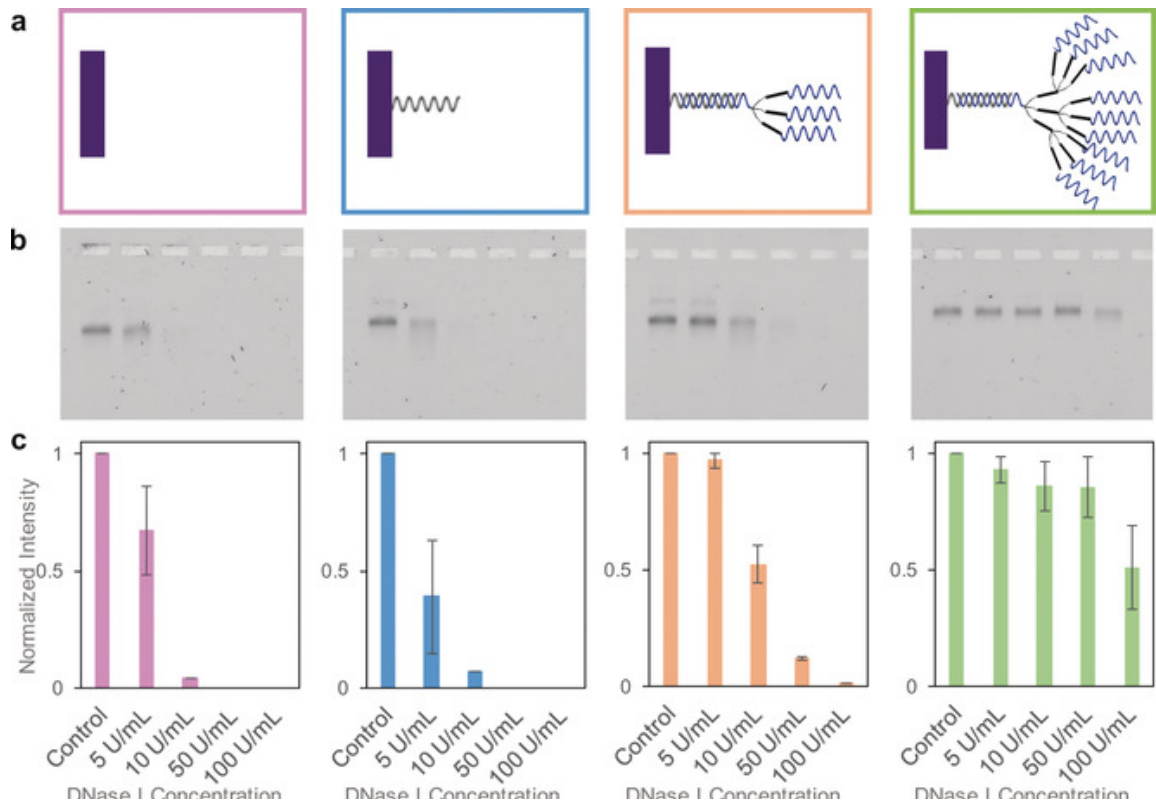
Учитывая эти недостатки, современные подходы к синтезу олигонуклеотид-олигонуклеотидных конъюгатов всё в большей степени опираются на реагенты для постсинтетической модификации. Такие реагенты открывают широкие возможности по синтезу гетерогенных конъюгатов, а также практически полностью решают проблему с делециями. На данный момент применение амидофосфитных разветвляющих реагентов последовательно снижается. Ниже приведены отдельные современные примеры использования амидитных реагентов/носителей для синтеза разветвлённых олигонуклеотидных конъюгатов.

На основе реагентов **10** и **12** были получены разветвлённые олигонуклеотидные конструкции, которые использовались для покрытия более крупных самоорганизующихся наноструктур – «ДНК-кирпичиков» (Рис. 2). Целью работы было повышение биосовместимости и стабильности высокомолекулярных структур в условиях пониженной концентрации двухвалентных катионов, а также в присутствии ферментов [190].



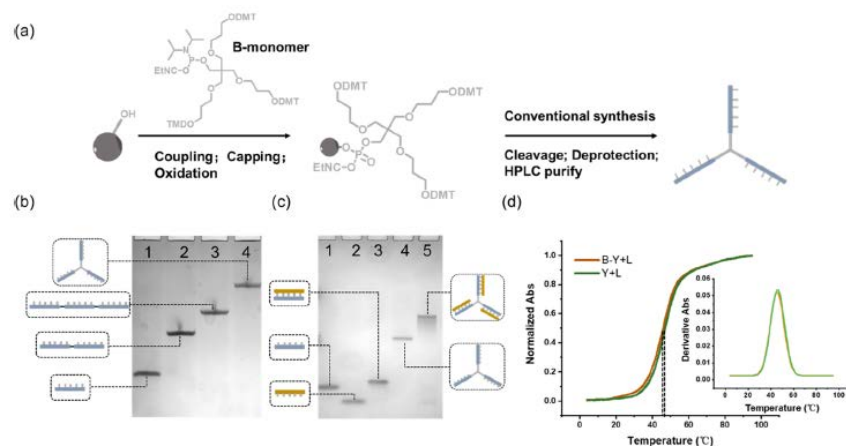
**Рис. 2.** Модификация «ДНК-кирпичиков» дендритными структурами 3:1 [190].

С помощью электрофореза и просвечивающей электронной микроскопии было показано, что наноструктуры (Рис. 3) проявили высокую стабильность при различных концентрациях ионов магния (10–40 мМ), независимо от молекулярной массы «кирпичика». Исследование нуклеазной стабильности под действием ДНКазы 1 показало высокую стабильность «кирпичиков» модифицированных разветвленными олигонуклеотидными заместителями, и крайне низкую стабильность немодифицированных «кирпичиков».



**Рис. 3.** Электрофоретический мониторинг стабильности различным образом модифицированных «ДНК-кирпичиков» в присутствии ДНКаз [190].

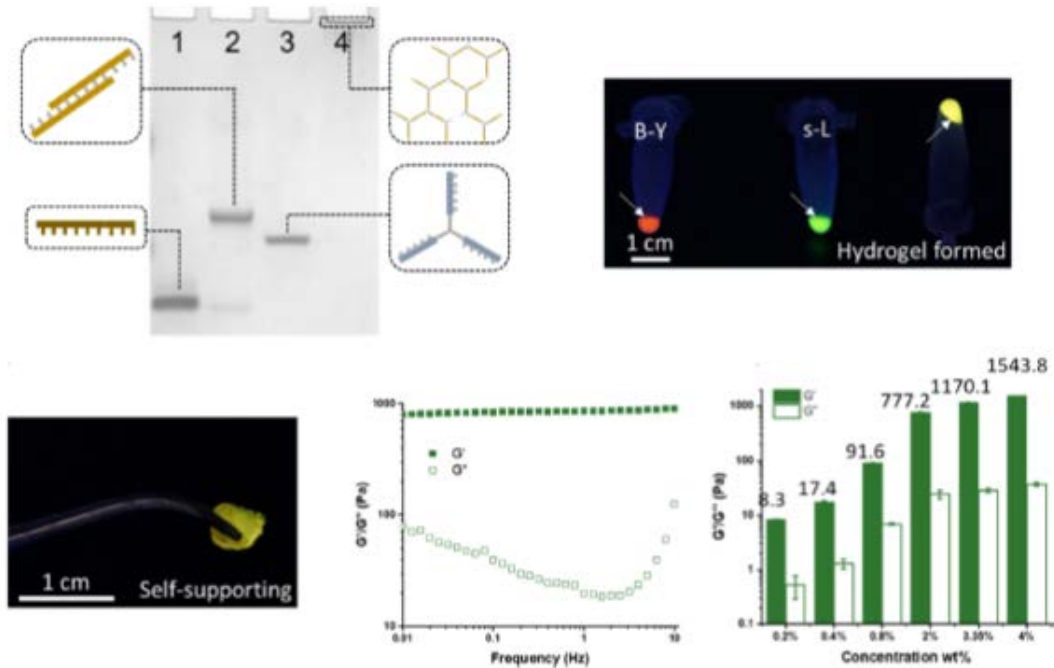
Модифицированные и немодифицированные разветвленными фрагментами ДНК-наноструктуры, захватывались клетками НЕК293Т. Блоки с разветвленными фрагментами обладали повышенной стабильностью внутри клеток и их концентрация за 30 ч инкубирования снизилась в два раза, в то время как немодифицированные блоки за 30 ч подвергались полному распаду внутри клеток [190].



**Рис. 4.** Синтез наноструктурных разветвлённых «мономеров» для получения ДНК-гидрогелей [181].

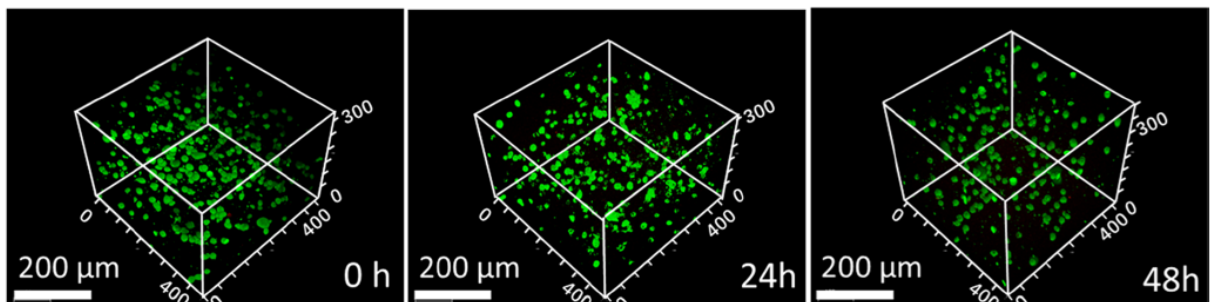
С использованием реагента **10** была разработана супрамолекулярная гидрогелевая система на основе ДНК. В качестве связующего и кросс-сшивающего реагента выступали

Y-образные олигонуклеотид-олигонуклеотидные конъюгаты. А в качестве основного строительного материала использовались неразветвленные дуплексы с двумя свободными одноцепочечными последовательностями (Рис. 4). Эти последовательности были подобраны комплементарно к олигонуклеотидам, входящим в состав разветвленных блоков. При их смешивании образовывался гидрогель, для которого изучали реологические свойства. Жидкое состояние сохранялось даже при 100% деформации (Рис. 5).



**Рис. 5.** Формирование ДНК-гидрогеля из наноструктурных блоков [181].

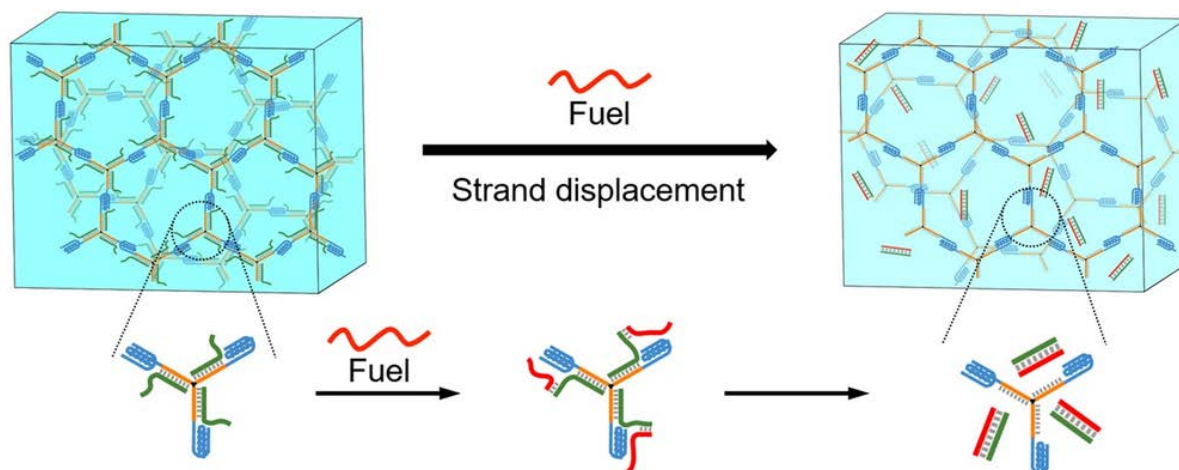
Полученные гидрогели использовались в качестве матрицы для расположения клеток в трехмерном пространстве (Рис. 6) [181].



**Рис. 6.** Визуализация клеток, распределённых в ДНК-гидрогеле [181].

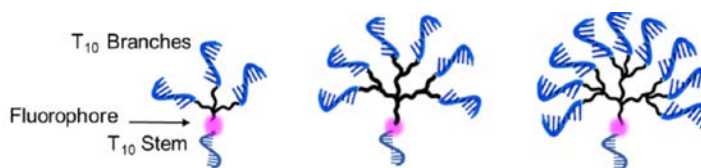
Также было показано, что жесткость гидрогелей можно варьировать с помощью реакции замещения последовательности путем добавления к гидрогелю дополнительного одноцепочечного фрагмента, вытесняющего комплементарный участок из структуры

разветвленного блока. Такое вытеснение приводит к увеличению гибкости структуры, и соответственно, к снижению жёсткости гидрогеля (Рис. 7) [192].



**Рис. 7.** Регуляция жёсткости ДНК-гидрогеле с помощью замещения цепей [192].

Используя раздваивающий реагент **7** и растроитель **12**, в процессе олигосинтеза были получены флуоресцентные разветвленные олигонуклеотидные конъюгаты – дендримеры (Рис. 8). В состав входили только олиго-Т последовательности, а выходы целевых блоков составляли от 0.5 до 12%. Олигонуклеотидные дендримеры исследовались в качестве кластеров, обладающих высокой проникающей способностью в клетки. В качестве модели использовались дендритные клетки костномозгового происхождения. Клетки обрабатывались конъюгатами дендримеров разной структуры с пептидом Ova и проточной цитометрией оценивалось содержание конъюгатов во внутриклеточном пространстве [182].



**Рис. 8.** Конструирование флуоресцентных разветвлённых олиготимидилатов [182].

Модифицирующие реагенты **10** и **12** также использовались для введения по 5'-концу модификации, стабилизирующей тромбиновый аптамер (Рис. 9) [184], в качестве реагента для введения N-ацетилгалактозаминных остатков в структуру siRNA для таргетной доставки в клетки печени через взаимодействие с асиалогликопротеиновым рецептором ASGPR [180,183].

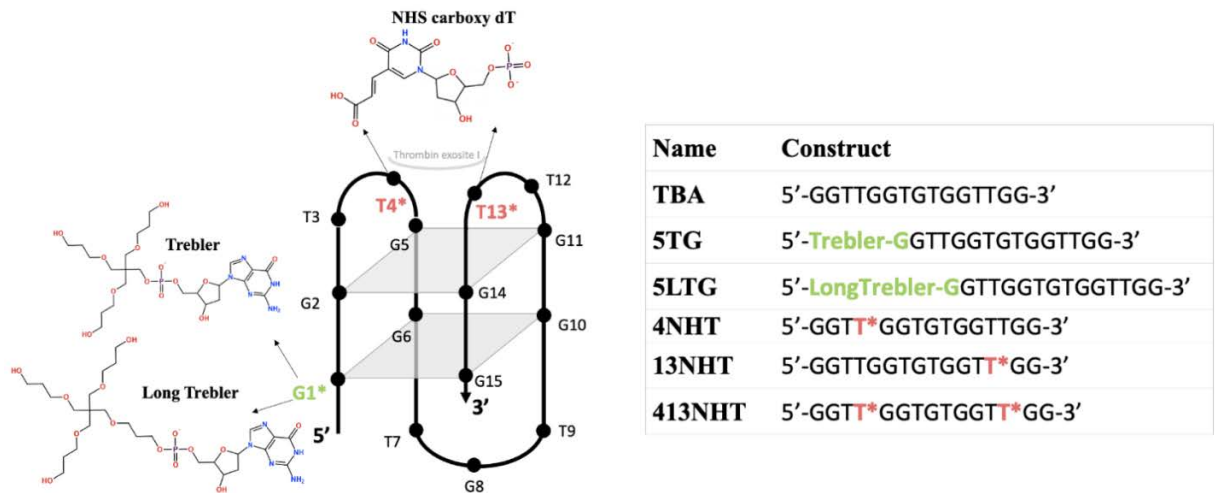


Рис. 9. Модификация тромбинового аптамера разветвлёнными олигонуклеотидами [184].

Реагенты **9** и **10** использовались для твердофазного синтеза разветвлённых олигонуклеотид-олигонуклеотидных конъюгатов [165], для синтеза конъюгатов и их самосборки в простые дискретные трехмерные ДНК-наноструктуры [167], а также при создании ди-, три- и тетра-валентных конъюгатов siRNA, ингибирующих SARS-CoV-2 [168,197] или ген *HTT*, представленный в фоторецепторных клетках сетчатки глаза для лечения макулярной дистрофии [169] в качестве потенциального аналога одобренного к применению препарата Macugen.

В работе [191] с использованием разветвляющего реагента **12** и дополнительного гексаэтиленгликольного спейсера были получены разветвленные конъюгаты, которые в дальнейшем собирались в простые дискретные наноструктуры типа «наноацетилен». Эти структуры содержали смысловую и антисмысловую последовательности, а также участок, узнаваемый РНКазой H. Обработка клеток U2OS-GFP<sub>Luc</sub> конъюгатами типа «наноацетилен» с пептидом Tet1 показала высокое подавление экспрессии гена GFP люциферазы (Рис. 10).

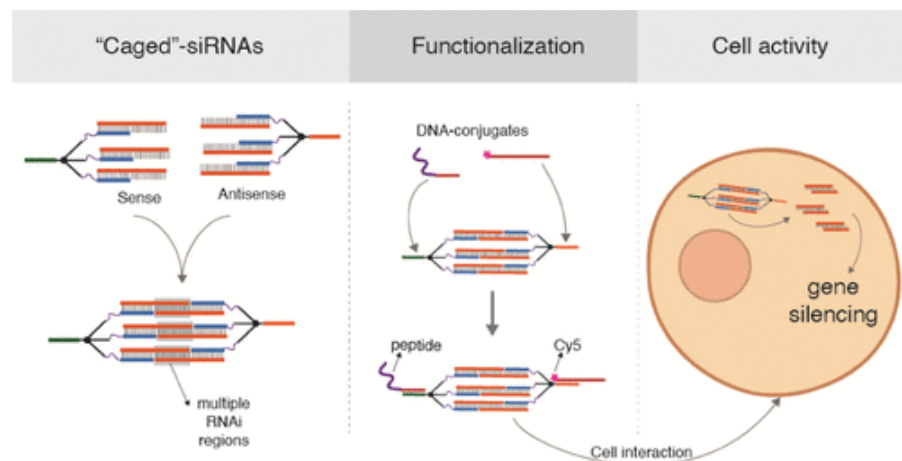
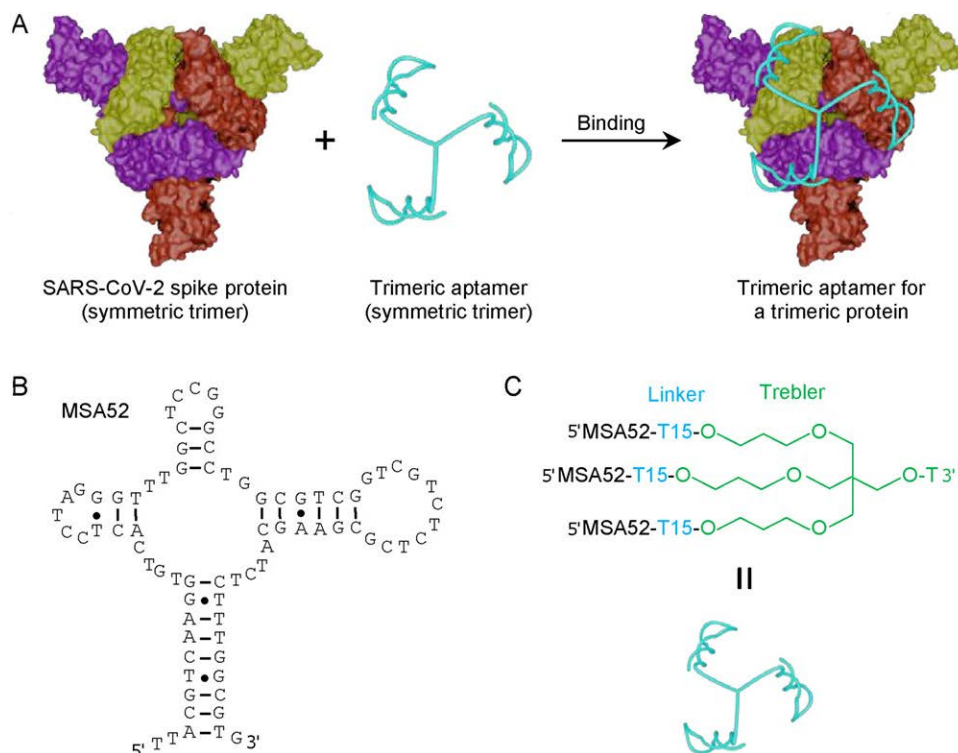


Рис. 10. «Наноацетиленовые» ДНК-структуры для ингибирования транскрипции генов [191].



Интересное применение реагента **10** показано в работе [185], где на его основе получен ковалентный тример аптамера MSA52 к S-белку SARS-CoV-2. Особенностью такого разветвлённого конъюгата является возможность прочного связывания тримерной мишени (Рис. 11). На основе полученного аптамерного тримера была сделана система детекции ряда штаммов SARS-CoV-2 в клинических образцах.

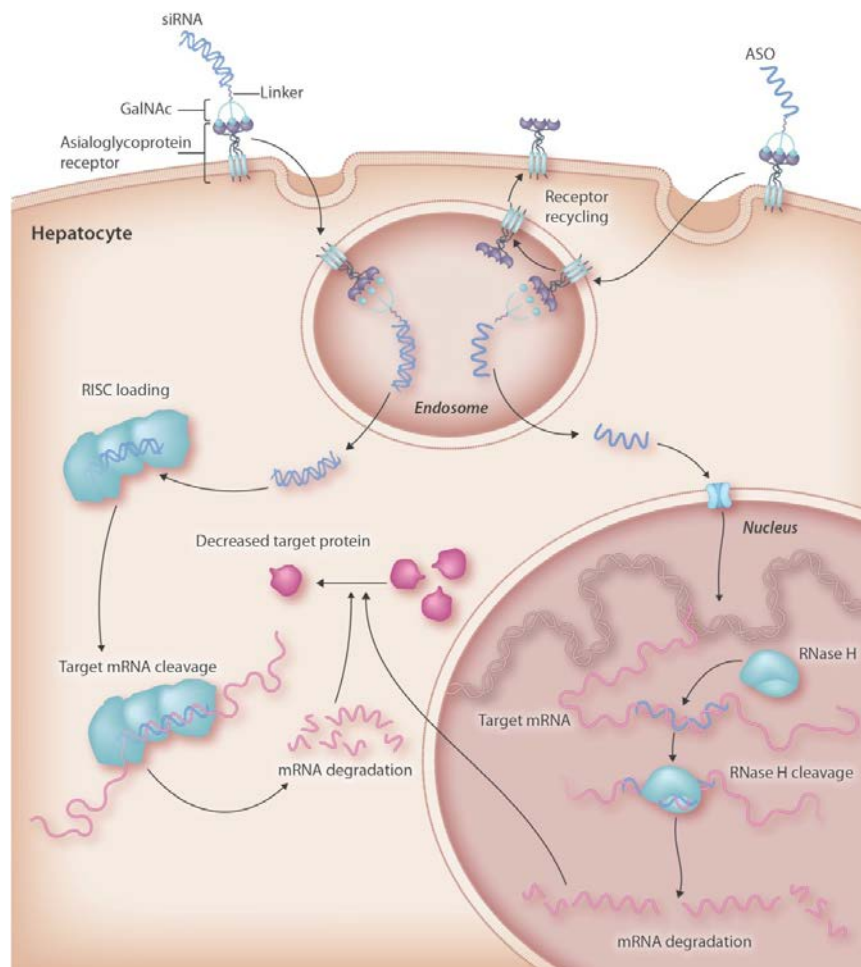


**Рис. 11.** Получение тримерного аптамера и его связывание с мишенью [185].

Таким образом, несмотря на значительные экспериментальные трудности применения разветвляющих фосфамидитных реагентов, имеются отдельные современные примеры конструирования на их основе разветвлённых конъюгатов.

## 1.2. Синтез олигонуклеотидов, содержащих разветвлённую N-ацетилгалактозаминовую модификацию

Конъюгаты антисмысловых олигонуклеотидов или siRNA с N-ацетилгалактозамином нашли свое применение в терапии заболеваний, поражающих печень. Подход основан на способности гепатоцитов печени экспрессировать асиалогликопротеиновый рецептор (ASGPR), который связывает и отделяет циркулирующие гликопротеины, в которых остаток сиаловой кислоты был удалён для обнажения углеводных остатков. ASGPR – это быстро интернализирующийся рецептор, представленный в количестве примерно 500 000 копий на гепатоцит. Были разработаны тримерные лиганды GalNAc для ASGPR, и они впервые были использованы для доставки олигонуклеотидов в печень более 20 лет назад [198].



**Рис. 12.** Доставка в клетки печени siRNA с помощью кластеров GalNAc [198].

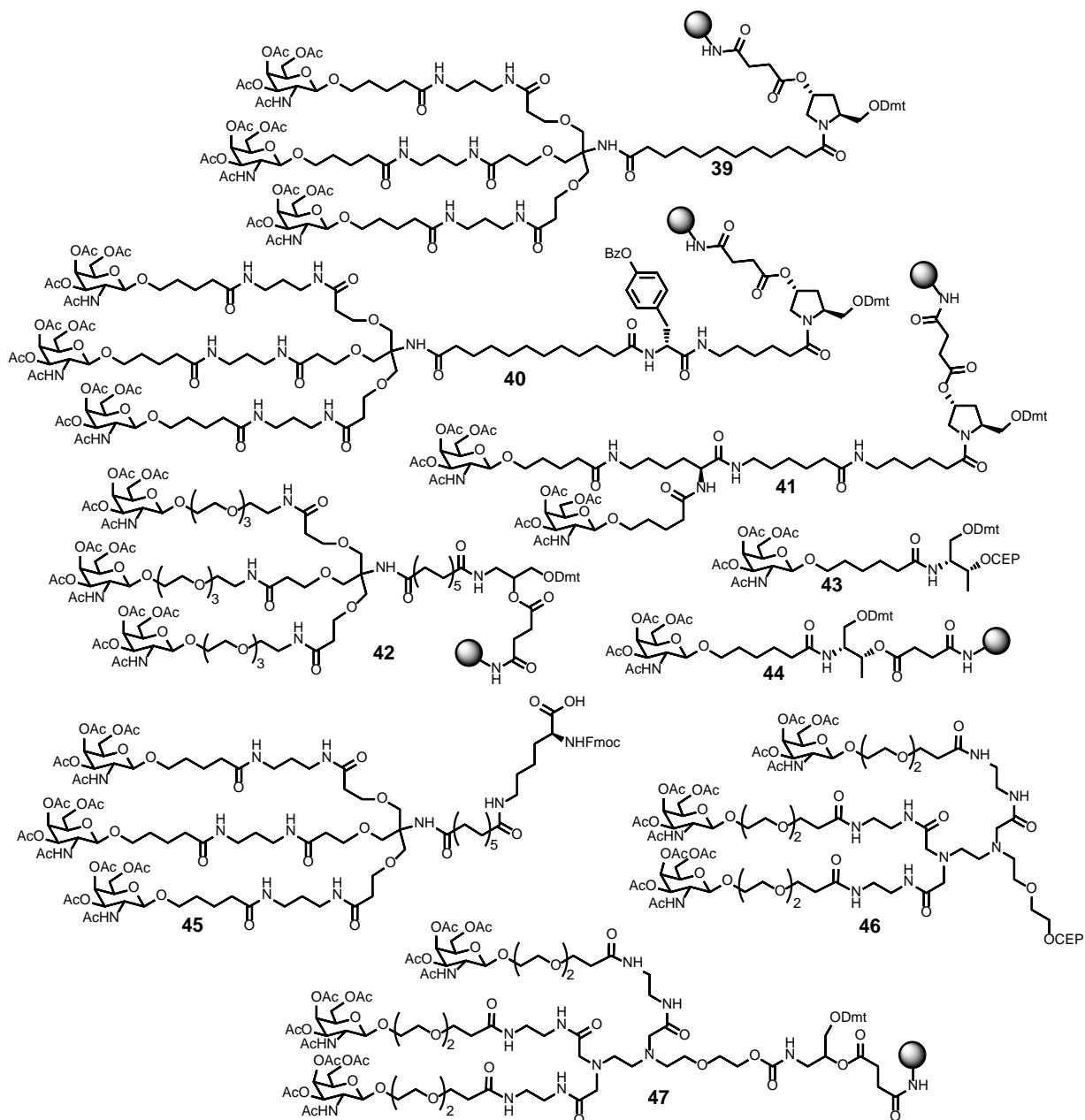
Конъюгаты GalNAc связываются с ASGPR и поглощаются эндосомами, где конъюгат отщелачивается от рецептора. Затем остатки GalNAc очень быстро лизируются и отделяются от олигонуклеотида, прежде чем олигонуклеотид выходит в цитоплазму по все еще плохо изученному механизму. Подход к доставке ASO и siRNA показан на Рис. 12.

Присоединение фрагмента GalNAc к ASO приводит к целенаправленной доставке в гепатоциты и повышению уровней препарата ASO в гепатоцитах примерно в 6–7 раз в сравнении с олигонуклеотидами, немодифицированными GalNAc. Эта повышенная доставка в гепатоциты значительно способствует приблизительно 7-кратному увеличению активности *in vivo* (50%-ное снижение мРНК SRB1 печени) по сравнению с неконъюгированным SRB1 [198].

ASGPR образован из двух субъединиц, ASGR1 и ASGR2, собранных в гетероолигомер в разных соотношениях. Способность рецептора связывать лиганды зависит от количества лигандов, которые могут одновременно связаться с рецептором. Сродство ASGPR к тримеру GalNAc в 1000 раз выше, чем к димеру или мономеру, в то время как тетрамер имеет лишь немногим более высокое сродство к рецептору по сравнению с тримером. Поэтому первоначальная работа по GalNAc-конъюгированным олигонуклеотидам была сосредоточена на использовании «трёхвалентного» кластера с расстоянием между углеводными фрагментами порядка 15–20 Å (между каждым остатком GalNAc). Чтобы достичь этой структуры, были выбраны две основные стратегии. Один из способов – синтезировать трёхвалентный кластер, а затем связать его с олигонуклеотидом либо путем постсинтетической конъюгации (например, амидной связи, фосфорамидитной связи или клик-химии), либо путем связывания кластера с твёрдой подложкой перед синтезом олигонуклеотида. Второй подход к построению кластера заключается в последовательном добавлении мономерного GalNAc во время синтеза олигонуклеотида. Этот последний подход обеспечивает большую гибкость и является предпочтительным для нетрёхвалентного кластера, и он выигрывает от легкой доступности мономеров [199].

Синтез конъюгатов олигонуклеотидов с кластерами GalNAc на данный момент опирается в основном на использование модифицирующих фосфамидитов или носителей [200]. Имеются также примеры получения модифицированных siRNA с помощью постсинтетических методов с использованием биортогональных реакций. На Рис. 13 представлен ряд реагентов **39–41** [201], **42–44** [202], **45** [203], **46–47** [204], применяемых для получения олигонуклеотидов, модифицированных GalNAc-кластерами. Большинство реагентов строится на основе трис(гидроксиметил)аминометана, который является доступным исходным разветвителем и позволяет сконструировать три линкера для удлинения цепи и наращивания N-ацетилгалактозаминового фрагмента, а оставшуюся аминогруппу использовать для построения линкерной части, соединяемой с олигонуклеотидом. Также разветвляющие реагенты могут строиться на основе пептидов (соединения **46**). В общем, реагенты, содержащие три- и ди- замещённые кластеры GalNAc, отличаются между собой длиной линкеров и их химической природой.

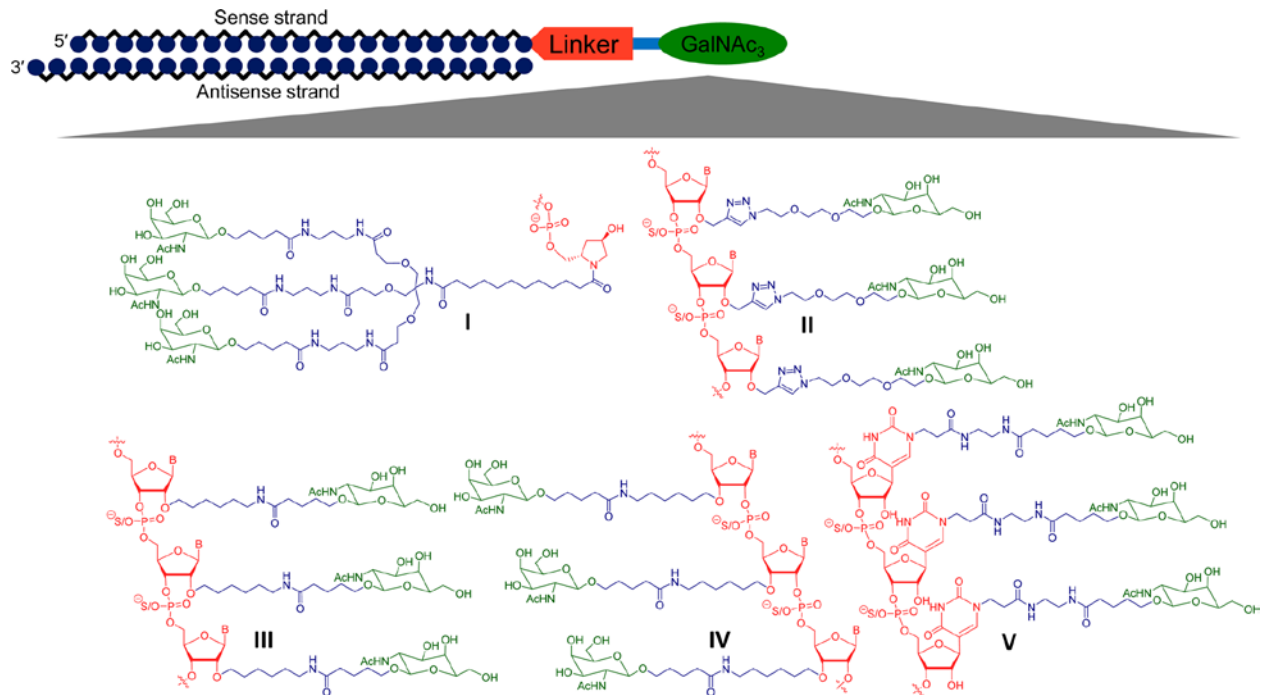
Например, вместо полиметиленовых цепочек могут использоваться более гидрофильные спейсеры на основе олигоэтиленгликолей, как в соединениях **46**, **47**. В работе [205] показано влияние структуры аномерного сайта в N-ацетилгалактозамине на метаболическую стабильность конъюгатов.



**Рис. 13.** Примеры структур модифицирующих фосфамидитов и носителей для синтеза олигонуклеотидов, содержащих кластеры GalNAc; кружком обозначен твердофазный носитель.

В работах [206,207] показано, что три кластеризованных мономерных единицы GalNAc, прикрепленные к siRNA, либо через рибосахар, либо через нуклеиновую основу, способом, который напоминает дизайн трёхвалентного лиганда, привели к образованию siRNA с рецептор-связывающими аффинностями, аналогичными исходным конструкциям (Рис. 14). Эти новые конъюгаты продемонстрировали *in vitro* и *in vivo* активность,

подобную соединениям, содержащим родительский трехантенный лиганд, пока размещение лиганда не мешало работе комплекса подавления РНК (RISC). Высказывается надежда, что такой простой дизайн трёхвалентных лигандов будет способствовать развитию надёжной ASGPR-опосредованной доставки терапевтических конструкций РНК-интерференции в гепатоциты, что является платформой с огромным потенциалом для лечения заболеваний, связанных с печенью.



**Рис. 14.** Структуры линейных и разветвленных кластеров GalNAc [206].

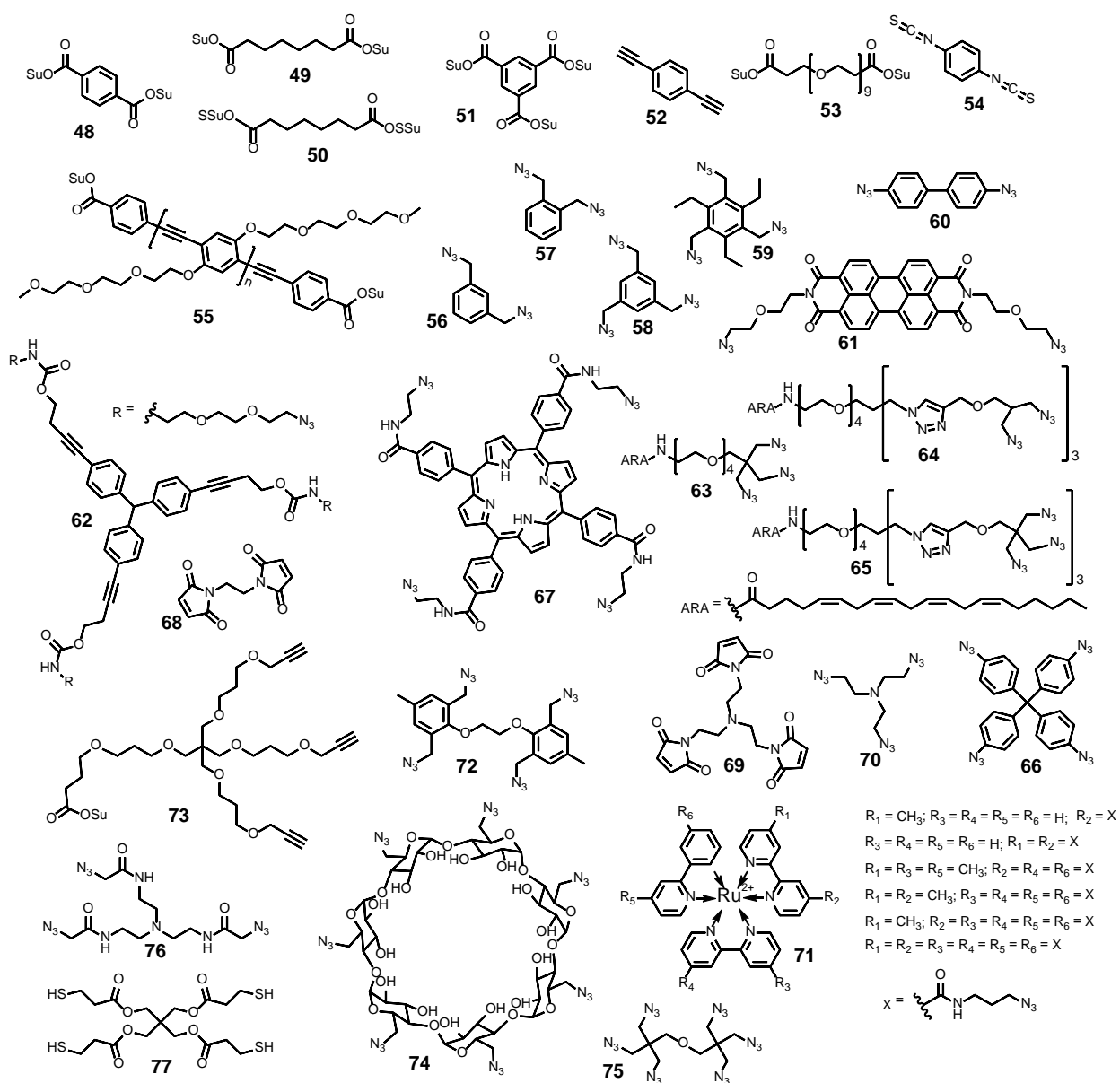
Дополнительные модификации антисмысловых и siRNA-олигонуклеотидов позволяют воздействовать на общую метаболическую стабильность и фармакокинетику конъюгатов [208,209], их активность [210] и гепатотоксичность [211]. N-Ацетилгалактозаминные кластеры оказались достаточно эффективными таргетизирующим фрагментами, а их относительно простой синтез и лёгкость введения в структуру олигонуклеотидов способствовали широкому изучению GalNAc-модифицированных антисмысловых олигонуклеотидов и siRNA. В доклинических и клинических испытаниях постоянно находятся препараты, нацеленные на доставку в печень терапевтических конъюгатов [212–216].

Таким образом, можно отметить, что модификация синтетических нуклеиновых кислот готовыми разветвлёнными реагентами к настоящему времени получила развитие в основном для случая GalNAc-кластеров. Однако, конструкции такого рода приобрели важнейшее терапевтическое значение.

### 1.3. Синтез разветвлённых олигонуклеотидных конъюгатов с использованием биоортогональных реакций

Получать модифицированные олигонуклеотиды умеренной длины (до 50–70 нуклеотидов) в синтезаторе можно с высоким выходом. Методы биоортогональной химии XXI века позволяют конъюгировать такие олигонуклеотиды друг с другом также с высоким выходом, что позволяет синтезировать олигонуклеотид-олигонуклеотидные конъюгаты, обходя все недостатки разветвляющих реагентов. Из всех биоортогональных реакций, для олигонуклеотидов наиболее удобным методом оказалось простейшее медь-катализируемое циклоприсоединение азидов и алкинов (CuAAC), а также его некаталитический вариант SPAAC [217–220], которые относятся к так называемой «клик-химии». В первую очередь, биоортогональные реакции были применены для простейших модификаций олигонуклеотидов, например, присоединения флуоресцентных красителей. В дальнейшем оказалось, что клик-реакции весьма эффективны и для синтеза олигонуклеотид-олигонуклеотидных конъюгатов. Терминальные алифатические алкины могут быть легко введены в олигонуклеотиды с помощью ненуклеозидных или нуклеозидных фосфамидитных реагентов или твердофазных носителей. Интересно, что даже циклооктины можно вводить в олигонуклеотиды с помощью фосфамидитных реагентов. В то же время, азиды способны реагировать по реакции Штаудингера с амидитами, которые содержат фосфор(III). Однако, эта реакция довольно медленная, и поэтому удалось получить азидоалкильный ненуклеозидный амидит (молекулу, содержащую одновременно P(III) и азид) и использовать его в олигонуклеотидном синтезе для введения в олигонуклеотид нескольких азидогрупп [221]. Но такой метод нельзя назвать удобным, поскольку азидный амидит может существовать только в растворе и полностью разлагается при попытке концентрирования/упаривания. Однако, низкая скорость реакции P(III) с азидом позволяет использовать азидо-модифицированные твердофазные носители для синтеза 3'-азидомодифицированных олигонуклеотидов. Имеется также ряд подходов к синтезу 5'-азидомодифицированных олигонуклеотидов, но они не слишком удобны в практике. В данной работе показано, что самым удобным способом получения 5'-азидомодифицированных олигонуклеотидов является клик-реакция 5'-алкиноолигонуклеотида с избытком алифатического водорастворимого диазида.

Также для синтеза олигонуклеотидных конъюгатов использовали другие биоортогональные реакции: взаимодействие тетразинов с *транс*-циклооктенами [222], циклооктинами [223], циклопропенами.

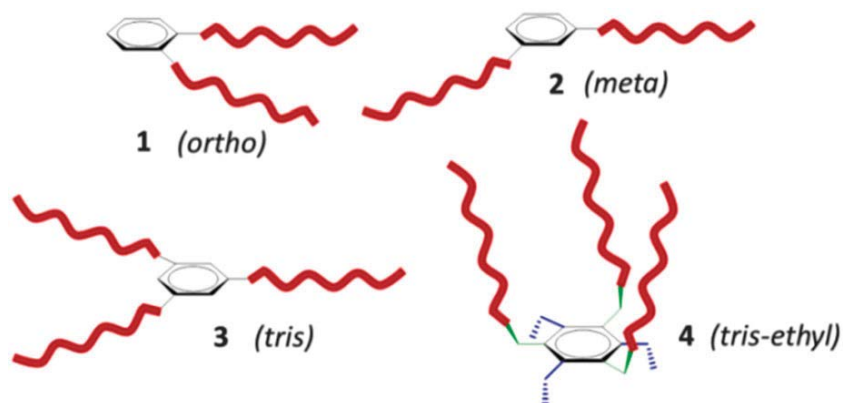


**Рис. 15.** Реагенты для постсинтетической сборки разветвлённых олигонуклеотидов/ олигонуклеотидных кластеров с помощью биоортогональных реакций.

Применение постсинтетических подходов к синтезу разветвленных олигонуклеотидных конъюгатов началось с реакций ацилирования. Данный метод не является полностью биоортогональным, так как используемые активированные эфиры могут взаимодействовать неспецифически с любыми первичными и вторичными аминогруппами. Реагенты **48–50** [224] и **51, 53–55** [225] использовались для получения димерных олигонуклеотидных конструкций взаимодействием свободной амино-группы олигонуклеотида с соответствующим активированным эфиром или изотиоцианатом.

С появлением медь-катализируемого азид-алкинового циклоприсоединения начались попытки синтеза разветвленных олигонуклеотидных конъюгатов на основе полиазидов и полиалкинов. На основе диалкина **52** [225] были получены димерные

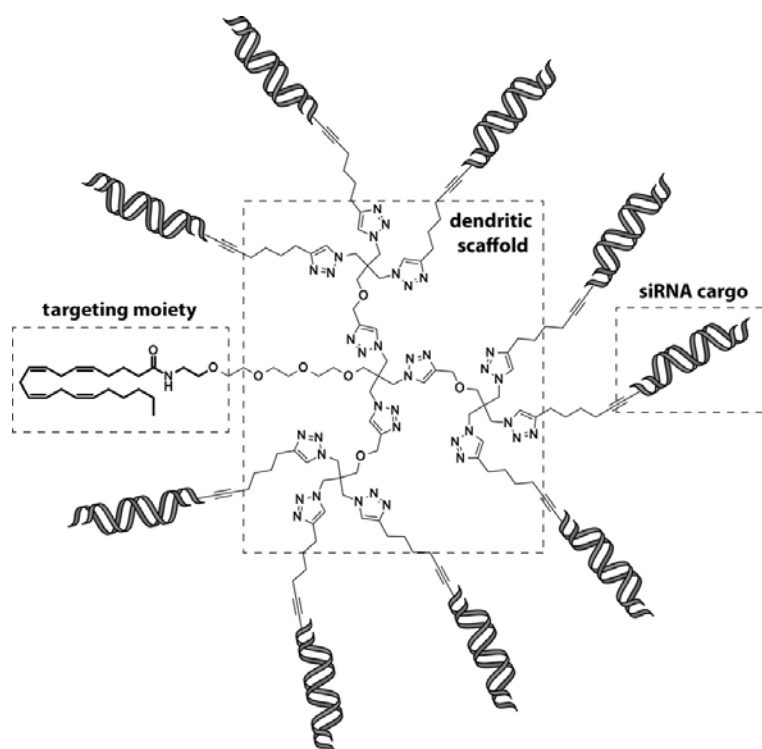
конъюгаты, а на основе полиазидов **56–59** [226] синтезировали разветвленные поли-С олигонуклеотидные конъюгаты.



**Рис. 16.** Разветвлённые структуры на основе азидов **56–59** и поли-С олигонуклеотидов [226].

На азидах **60–62** был показан синтез ди- и тризамещенных конъюгатов, а также их применение для сборки простых дискретных наноструктур для исследования фотофизических свойств новой пирен-периленовой пары полиароматических красителей [227].

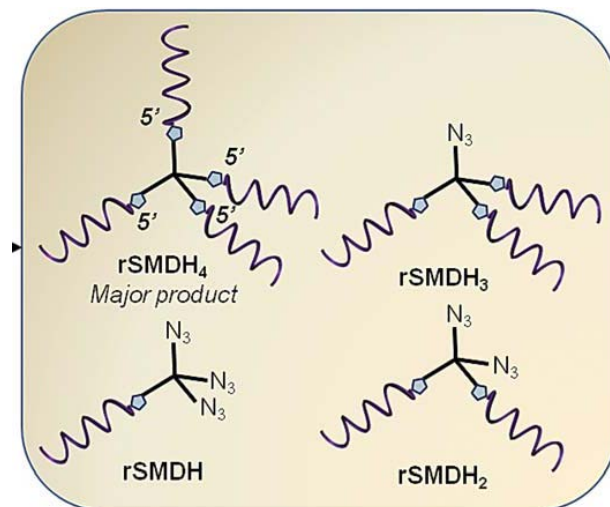
Соединения **63–65**, содержащие несколько азидогрупп и остаток арахидоновой кислоты использовались в качестве разветвляющих пост-синтетических реагентов для получения дендримерных конструкций из малых интерферирующих РНК для их доставки внутрь клетки (Рис. 17) [228].



**Рис. 17.** Одна из структур, содержащих несколько siRNA и фрагмент арахидоновой кислоты, полученная с помощью клик-реакции [228].

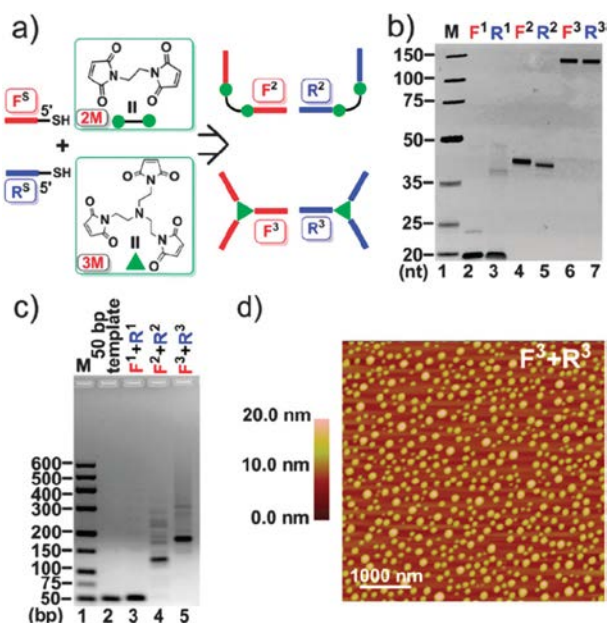


Тетраазид **66** использовался в синтезе конъюгатов, содержащих четыре одинаковых олигонуклеотида, и конъюгата со стехиометрией 3:1 (3 олигонуклеотида одной последовательности и один с отличной последовательностью) [188,229].



**Рис. 18.** Примеры разветвлённых олигонуклеотидных конструкций на основе тетразида **66**, полученные твердофазной клик-реакцией [188].

Похожие конъюгаты с использованием порфиринового ядра **67**, содержащего четыре азидогруппы, были получены для разветвленных наноконструкций, содержащих четыре золотые наночастицы [230].



**Рис. 19.** Использование разветвлённых олигонуклеотидов в качестве праймеров для ПЦР и для сборки крупных наночастиц золота [231].

Малеимид-тиольная конъюгация также не является строго биортогональной, хотя есть несколько примеров разветвляющих реагентов на основе ди- и трималеимидов **68** и **69**. Конъюгаты на их основе применялись в качестве праймеров в полимеразной цепной реакции для наращивания длины олигонуклеотидных фрагментов (Рис. 19) [231,232].

Звездообразные трехлучевые конъюгаты в качестве праймеров для ПЦР синтезировали также с использованием клик-реакции триазида **70** и алкин-модифицированных праймеров (Рис. 20) [233].

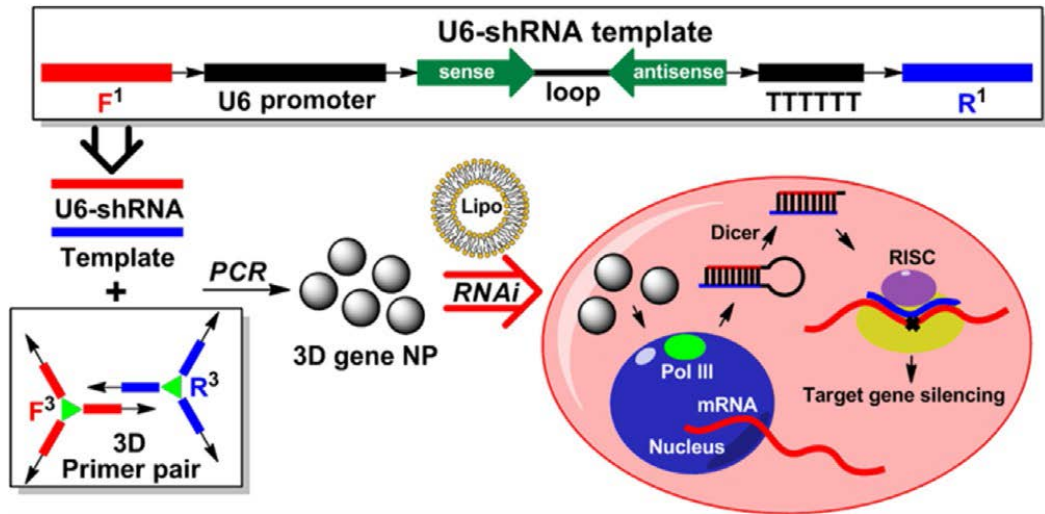


Рис. 20. Сборка наночастиц для доставки siRNA с помощью ПЦР и разветвлённых праймеров [233].

В работе [234] описан синтез и применение полиазидопроизводных рутениевого комплекса **71**, содержащего от 1 до 6  $N_3$ -групп. Эти реагенты вступали в реакцию с алкиновыми производными олигонуклеотидов, образуя разветвленные конъюгаты, разделение которых проводилось с помощью электрофореза (Рис. 21).

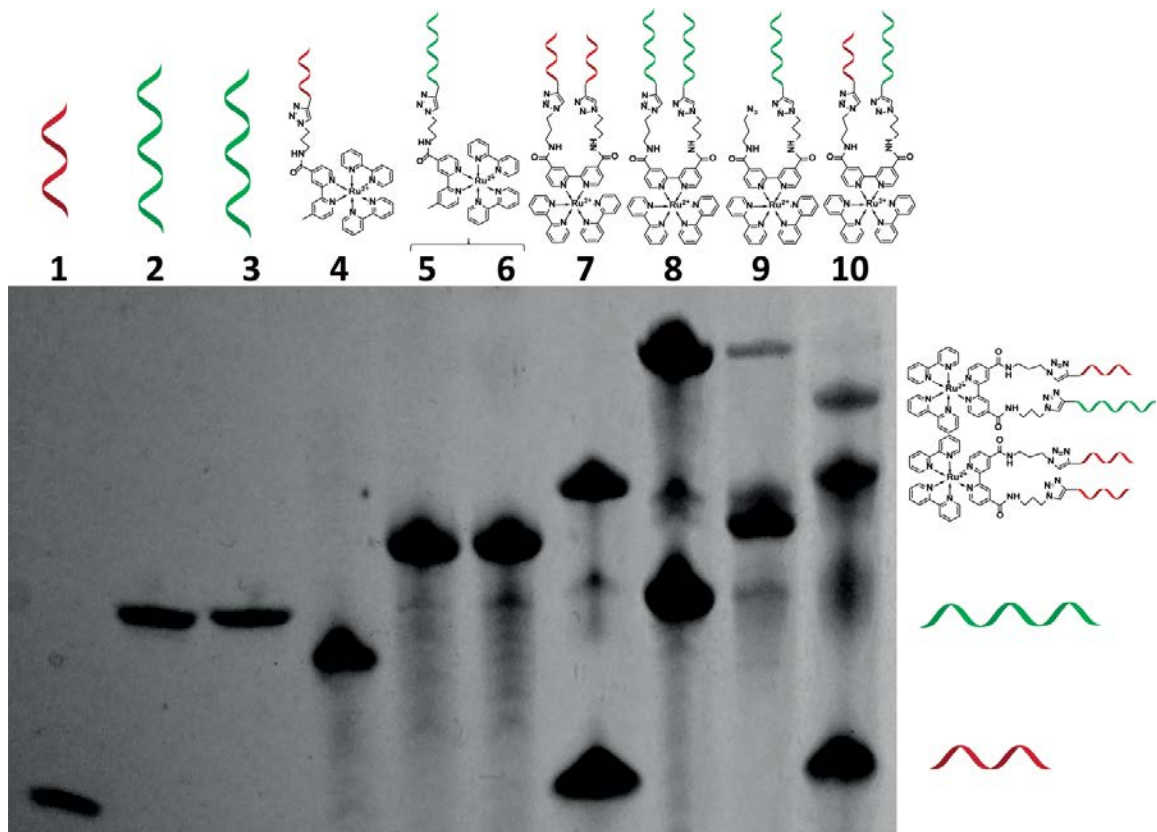


Рис. 21. Аналитический электрофорез конъюгатов на основе рутениевого комплекса **71** [234].

Азиды **58** и **72** использовались в качестве сшивающих молекул для образования конъюгатов, заранее собранных с помощью шаблонов. После разделения, получались трёх- и четырёхлучевые олигонуклеотидные конструкции [235].

Реагент **73** на основе бифункционального производного пентаэритрита описан в работе [236]. Предполагается, что активированный эфир способен модифицировать аминокислотный олигонуклеотид, а затем к полученному конъюгату по трём алкиновым группам можно присоединить с помощью клик-реакции три азидосодержащих олигонуклеотида.

В работе [237] показано применение семичленного циклодекстрина в качестве разветвляющей молекулы **74**. Семь гидроксиметильных групп превратили в семь азидометильных групп, которые вступают в клик-реакцию с алкин-содержащими олигонуклеотидами. Получаемые конъюгаты с siRNA использовались в качестве нагрузки на наночастицы и доставки интерферирующих РНК во внутриклеточное пространство (Рис. 22).

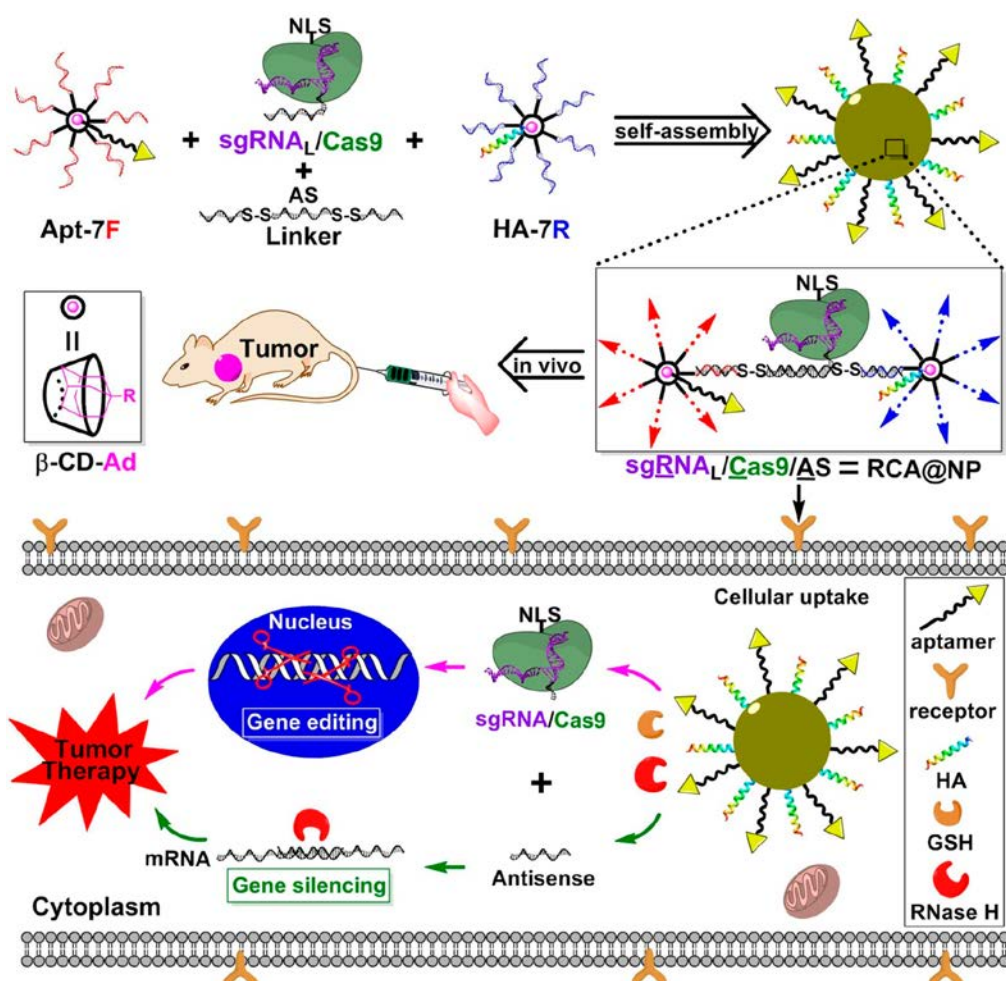
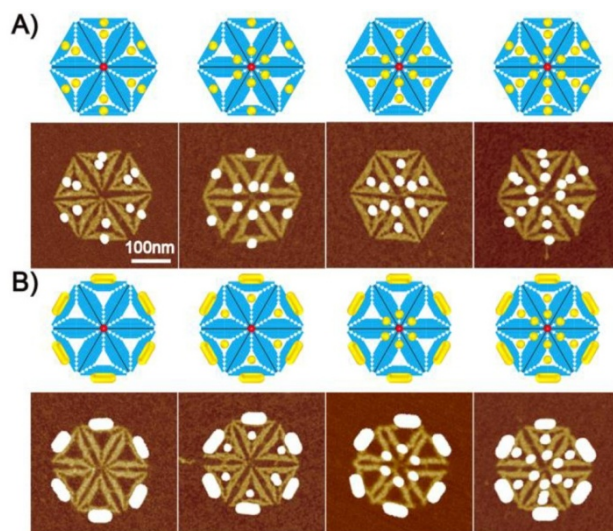


Рис. 22. Схема применения конъюгатов на основе реагента **74** [237].

Интересное применение разветвляющего реагента было показано в работе [238], где несколько молекул доксорубина располагались на дендримерной структуре за счёт

образовании гидразона. Разветвляющий реагент содержал терминальный алкин, что позволило ввести его в состав аптамера с помощью клик реакции и значительно повысить полезную нагрузку цитотоксического препарата на одну молекулу аптамера.

Гексаазид **75** на основе дипентаэритрита нашел применение в качестве реагента при создании структурных мотивов более сложной архитектуры во время сборки ДНК-оригами [239]. Динамические наноструктуры также получались на основе триазида **76**, трёхлучевые конъюгаты (Рис. 23) проявляли динамические свойства в зависимости от присутствия стрептавидина в качестве эффекторной управляющей молекулы [240].



**Рис. 23.** Наноструктуры из гексаазида **75**, содержащие наночастицы золота [239].

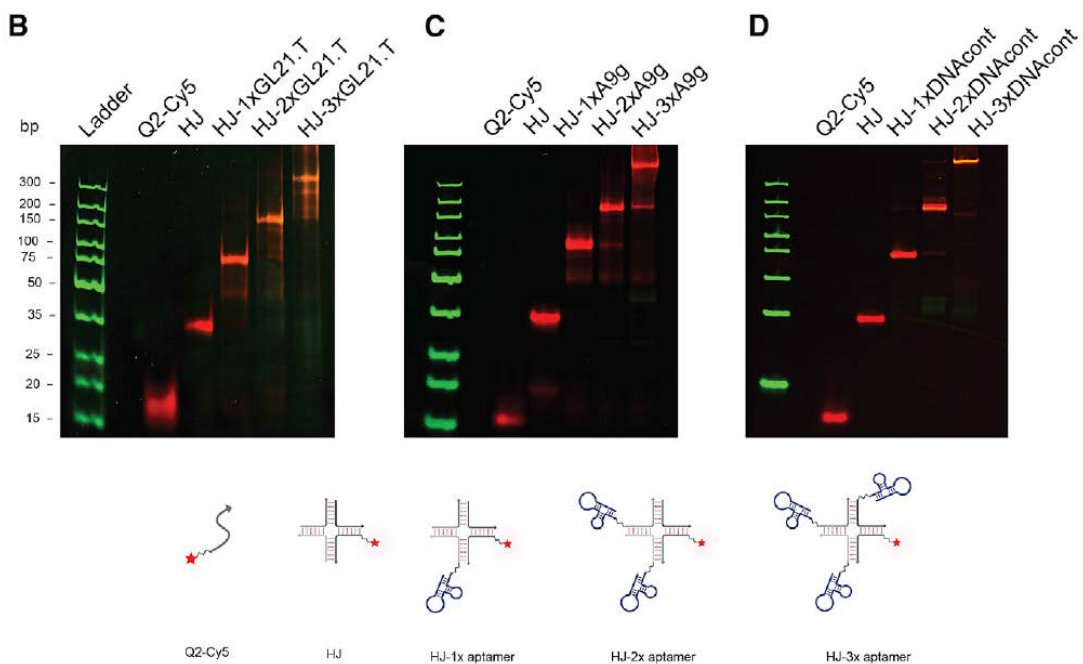
Политиольный реагент **77** использовался для создания ядра, несущего несколько олигонуклеотидов при образовании достаточно крупных частиц [241].

В целом, наиболее удобным методом синтеза разветвленных конъюгатов является медь-катализируемая реакция азид-алкинового циклоприсоединения. Большинство работ, посвящённых постсинтетической сборке ковалентных олигонуклеотидных конструкций для различного применения опирается на эту реакцию из-за ее удобства, высокой конверсии, биоортогональности и скорости.

#### 1.4. Разветвлённые конъюгаты аптамеров

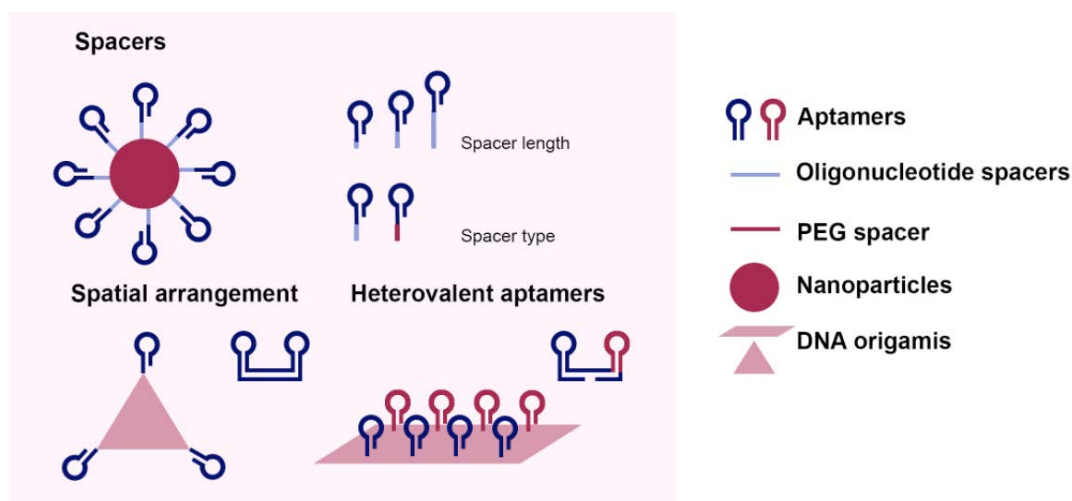
«Многовалентные» взаимодействия часто встречаются в биологических системах и обычно обеспечивают более высокую связывающую способность и селективность в распознавании мишени, чем когда действуют только одновалентные взаимодействия. Поэтому разработка двухвалентных или многовалентных аптамерных конъюгатов, распознающих конкретную биологическую мишень или несколько мишеней, активно развивается последние десятилетия [242]. Действительно, аптамеры на основе олигонуклеотидов являются подходящими строительными блоками для разработки высокоэффективных многовалентных систем, поскольку их можно легко модифицировать и собирать, используя соответствующие соединительные линкеры различной природы. Таким образом, были предприняты значительные исследовательские усилия по созданию димерных/мультимерных версий эффективных аптамеров с различной степенью успеха в связывающей способности цели или усилении терапевтической активности. Большинство разработанных конструкций проявляют улучшенные характеристики с точки зрения связывающей способности или терапевтической активности в качестве противовоспалительных, противовирусных, антикоагулянтных и противораковых агентов, и их число, безусловно, будет расти в ближайшем будущем [243,244].

Большинство разветвленных аптамерных конъюгатов строится на нековалентных взаимодействиях за счет образования дуплексов между несколькими аптамерами и линкерной цепочкой нуклеиновой кислоты. Могут использоваться более сложные трёх- и четырёхходовые сочленения Холлидея в качестве разветвляющего мотива (Рис. 24) [245].



**Рис. 24.** Конструирование поливалентных аптамеров на основе сочленений Холлидея [245].

Есть примеры построения аптамерных конструкций с использованием ранее рассмотренных методов на основе разветвляющихся амидофосфитных реагентов [185]. На Рис. 25 показан набор классических подходов к организации мультивалентных аптамерных конъюгатов. Они могут быть линейного вида, сферическими, дендримерными, а также строиться на основе более сложных НК-наноструктурах. По своей специфичности конструкции бывают гомогенными и гетерогенными. Первый вариант предполагает, что в конъюгате все аптамеры одного вида с одной специфичностью и последовательностью. Гетерогенные конъюгаты содержат аптамеры с разными последовательностями, специфичностью и/или мишенями [246].



**Рис. 25.** Гетерогенные аптамерные конъюгаты [246].

Интересный подход к синтезу поливалентных РНК-конъюгатов описан в работах [247,248], где матрицей для ферментативного синтеза является плазида, процессируемая РНКазы-дефицитными клетками. Такой подход позволил получать ди-, три- и тетравалентные конструкции.

В основном, текущее развитие мультивалентных аптамерных конъюгатов опирается на нековалентные подходы, в то время как химические постсинтетические методы пока развиты слабо. Однако, перспективность таких конструкций достоверно продемонстрирована, что приведёт к росту актуальности удобных методов для их синтеза. В настоящем исследовании сделана попытка разработать удобную процедуру получения кластеров аптамеров (мультивалентных аптамеров) на основе постсинтетического подхода и биоортогональной клик-реакции.

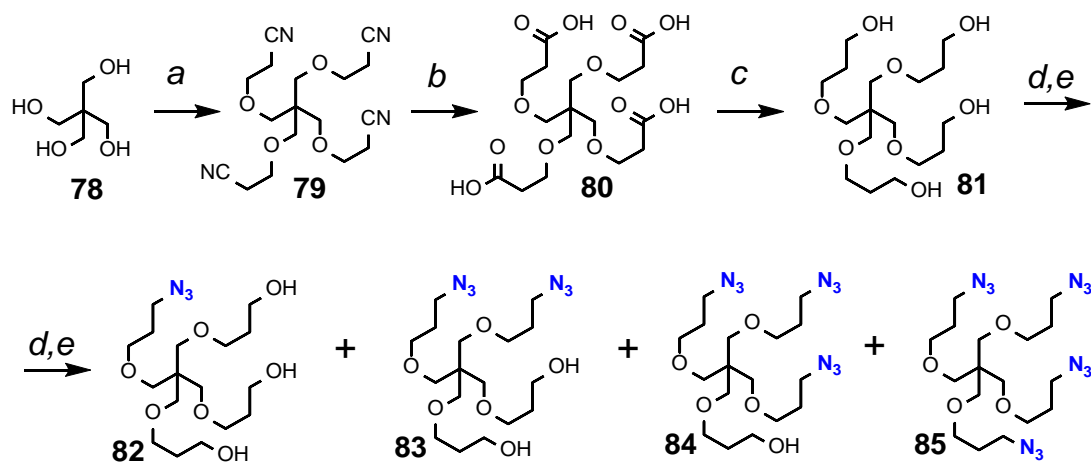
Таким образом, спектр потенциальных приложений разветвлённых олигонуклеотидных конъюгатов, в том числе олигонуклеотид-олигонуклеотидных, огромен. Методы синтеза таких конструкций развивались достаточно медленно из-за их громоздкости и мультидисциплинарности областей их применения. Применялись ферментативные и синтетические подходы, разветвлённые конъюгаты конструировали прямо на твёрдой фазе с помощью различных модифицирующих реагентов. В настоящее время представляется, что наилучшие возможности для синтеза таких конъюгатов открывает комбинация постсинтетических подходов с биоортогональными реакциями. Доступность сложных разветвлённых/олигонуклеотид-олигонуклеотидных конъюгатов позволит интенсифицировать их внедрение в практику в качестве ген- или других мишень-направленных инструментов, диагностических и терапевтических агентов и т.д. Данная работа посвящена разработке и совершенствованию методологии получения таких конъюгатов.

## Глава 2

### Разработка подходов к синтезу разветвлённых олигонуклеотидных конъюгатов (результаты и обсуждение)

#### 2.1. Разветвляющие реагенты на основе пентаэритрита

На основе пентаэритрита **78** синтезированы разветвляющие реагенты **83**, **84** и **85**, несущие две, три и четыре азидогруппы, соответственно (Схема 1). В качестве побочного продукта выделен и охарактеризован азидоспирт **82**, который не использовался в данной работе. Его применение в качестве гидрофилизатора липофильных соединений показано в работе [249]. Применение для превращений **78**→**79**→**80**→**81** описанных в литературе условий [250,251] давало в наших руках неудовлетворительные результаты, поэтому методики были немного модифицированы. Ключевой тетраол **81** получен с помощью модифицированной трехстадийной методики синтеза.



**Схема 1.** Синтез разветвленных полиазидов. *a*) акрилонитрил/ТВАН/вода, кт, 24 ч, 65%; *b*) HCl conc., 80°C, 4 ч, 95%; *c*) BMS/THF, 50°C, 1 ч, 67%; *d*) MsCl/Et<sub>3</sub>N/DCM; *e*) NaN<sub>3</sub>/DMSO, 48 ч.

Спирт **81** мезилировали тремя молями мезилхлорида, а затем полученную смесь мезилатов<sup>1</sup> обрабатывали избытком азидата натрия в DMSO. Смесь азидов **82–85** (Схема 1) разделяли колоночной хроматографией на силикагеле. Выходы чистых соединений **83–85** составили 8%, 29% и 26% соответственно (Методика 2, Экспериментальная часть).

При необходимости смещения состава продуктов реакции в сторону менее замещенных азидов, избыток мезилхлорида по отношению к тетраолу **81** на стадии *d* (Схема 1) может быть уменьшен до значения 1.2. В таком случае последующее

<sup>1</sup> Перед проведением следующей стадии необходимо тщательное удаление растворителя (DCM), чтобы исключить образование взрывчатого диазидометана.

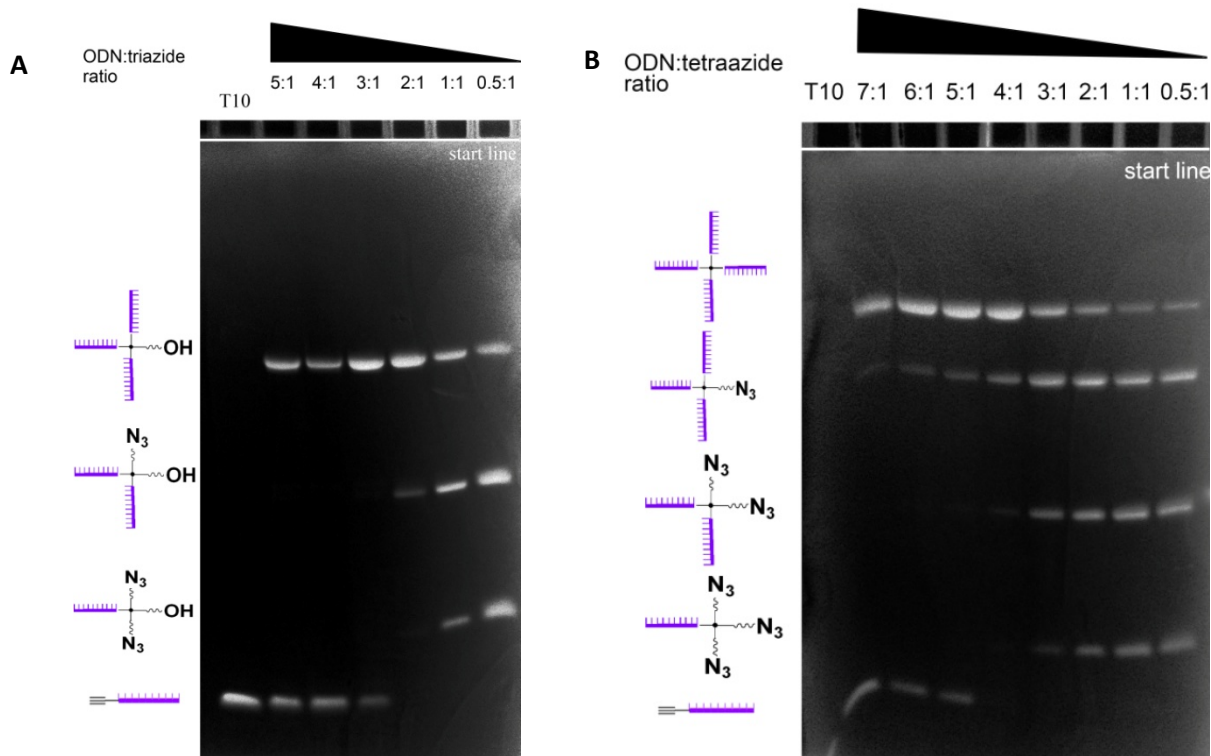


нуклеофильное замещение избытком азидов натрия приводит к образованию соединений **82** и **83** с выходами 32% и 27% соответственно (Методика 1, Экспериментальная часть). Избыточное мезилирование тетраола **81** с последующим нуклеофильным замещением азидом натрия приводит к образованию тетраазидов **85** с выходом 90% (Методика 3, Экспериментальная часть).

## 2.2. Синтез разветвлённых олигонуклеотид-олигонуклеотидных конъюгатов

Азиды **83–85** легко вступают в медь-катализируемую реакцию азид-алкинового циклоприсоединения (клик-реакцию) с алкин-модифицированными олигонуклеотидами в водно-органическом растворе. Оптимальными условиями реакции являются значения начальных концентраций алкин-модифицированных олигонуклеотидов не ниже 200 мкМ, концентрации меди(I) и аскорбиновой кислоты более 1 мМ, при этом время реакции составляет несколько часов. Стехиометрия олигонуклеотид-олигонуклеотидных конъюгатов может варьироваться избытком алкин-модифицированного олигонуклеотида. Получаемые продукты аналитически и препаративно разделялись с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на обращенной фазе, а также с помощью денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ). Такой подход предполагает неограниченный потенциал синтеза симметричных (гомогенных) и несимметричных (гетерогенных) разветвленных олигонуклеотид-олигонуклеотидных конъюгатов. Гетерогенные олигонуклеотид-олигонуклеотидные конъюгаты могут включать в свой состав несколько разных олигонуклеотидов, либо олигонуклеотиды и флуоресцентный краситель.

Сначала были изучены условия клик-реакции с использованием модельного олигонуклеотида T<sub>10</sub>. Конъюгация алкин-модифицированного олигонуклеотида с азидными реагентами **84** и **85** привела к образованию набора продуктов. Анализ реакционных смесей проводили в денатурирующем 19% ПААГ (Рис. 26). Соотношение продуктов в реакционных смесях варьировалось избытком алкин-модифицированного олигонуклеотида T<sub>10</sub> по отношению к триазиду **84** (Рис. 26А) и тетраазиду **85** (Рис. 26В).



**Рис. 26.** Анализ в денатурирующем 19% ПААГ реакций конъюгации олигонуклеотида  $T_{10}$  с триазидом **84** (А) и тетраазидом **85** (В) в различных соотношениях.

Продукты мигрируют в зависимости от количества олигонуклеотидов в составе конъюгата – чем больше олигонуклеотидных звеньев содержит блок, тем медленнее он движется в геле. Как видно из изображений геля (Рис. 26), продукты полного присоединения (трис- или тетракис-) образуются при любом соотношении разветвляющего реагента и олигонуклеотида. В реакции доминирует трис-продукт триазида **84**, начиная с соотношения 2:1, и становится единственным продуктом при соотношении 3:1 и выше.

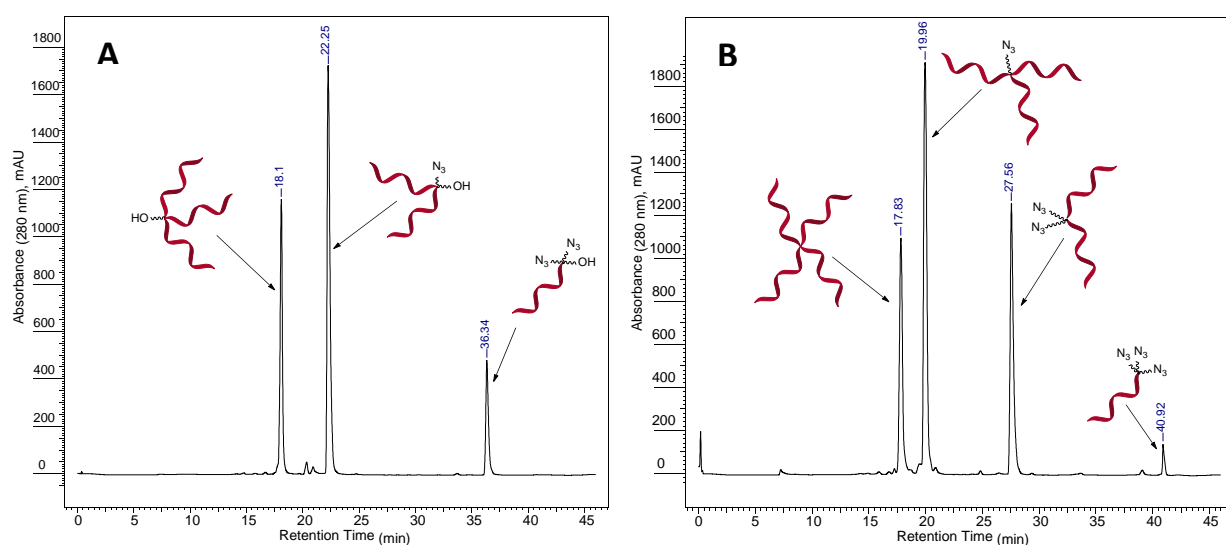
Тетрапродукт тетраазида **85** становится основным при соотношении 4:1. Однако следовые количества трис-продукта присутствуют всегда, даже при более высоких избытках олигонуклеотида.

Выходы выделенных продуктов триазида **84** (соотношение олигонуклеотид : реагент, 2 : 1) после элюирования из геля составляли: 12% трис-продукта, 11% бис-продукта, 5% моно-продукта, а для тетраазида **85** (соотношение олигонуклеотид : реагент, 3 : 1): 8% тетракис-продукта, 11% трис-продукта, 9% бис-продукта, 3% моно-продукта. Выходы элюции конъюгатов из геля зависят от степени замещения разветвляющего реагента.

Частичное присоединение олигонуклеотидов к разветвляющим реагентам **84** и **85** более привлекательно, чем полное присоединение ко всем доступным азидо-группам, так

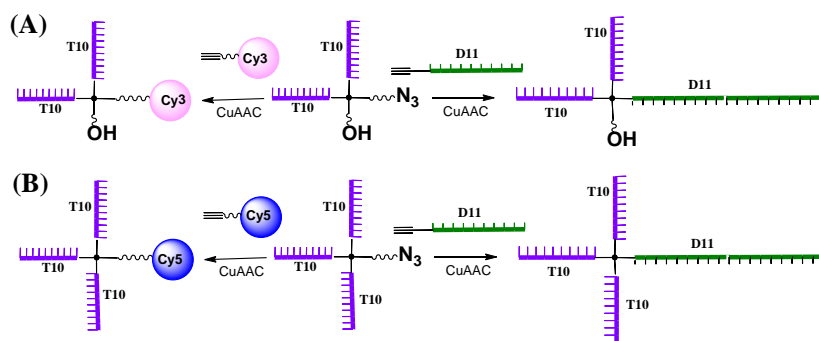
как открывает возможность дальнейшей модификации остаточных азидо-групп другими заместителями с получением несимметричных гетерогенных блоков.

Путем снижения соотношения олигонуклеотида к полиазиду с 5 до 2 для реагента **84** и соотношения с 7 до 3 для реагента **85**, можно получить образование продуктов с одной или несколькими незатронутыми азидо-группами. Разделение реакционной смеси может проводиться с помощью ВЭЖХ (Рис. 27) со значительно более высоким выходом по сравнению с денатурирующим электрофорезом: 32% трис- продукта, 52% бис-продукта, 16% моно-продукта из триазида **84** (Рис. 27А – соотношение 2:1) и 25% тетракис-продукта, 42% трис-продукта, 28% бис-продукта, 5% моно-продукта из тетраазида **85** (Рис. 27В – соотношение 3:1).



**Рис. 27.** ВЭЖХ-профили частичной функционализации азидов **84** (А) и **85** (В) олигонуклеотидом  $T_{10}$  в соотношениях 2 : 1 и 3 : 1, соответственно.

Каждый пик с препаративной ВЭЖХ и каждая полоса с препаративного электрофореза в ПААГ были выделены, и их состав был подтвержден методом ВЭЖХ-МС. Наличие свободных азидо-групп в выделенных продуктах неполного присоединения позволило синтезировать несимметричные гетерогенные разветвленные конъюгаты на основе азидов **84** и **85** (Схема 2).

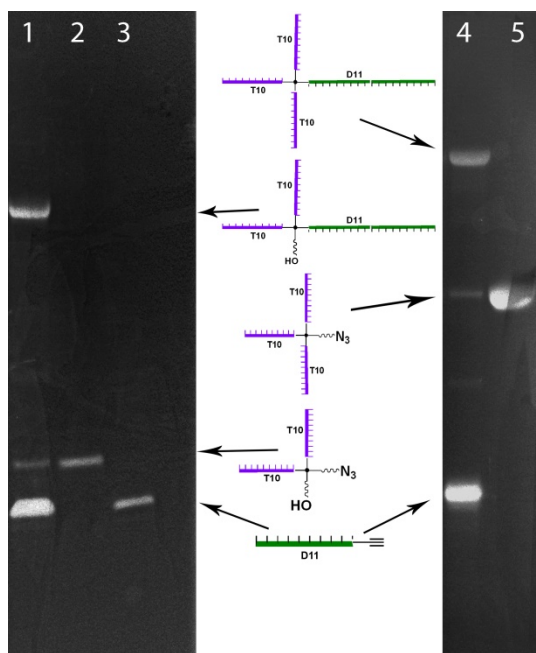


**Схема 2.** Дальнейшая модификация частично функционализированных разветвленных олигонуклеотид-олигонуклеотидных конъюгатов из триазида **84** (А) и тетраазида **85** (В).

Модельные эксперименты показали, что азидогруппы способны к дальнейшей конъюгации после первой клик-реакции и выделения на препаративной ВЭЖХ. Были выполнены реакции мечения флуоресцентными алкиновыми производными цианиновых красителей Су3 и Су5. Реакции проходили с высокой степенью конверсии более 95%.

Аналогичные реакции были проведены для присоединения алкин-модифицированного олигонуклеотида с другой последовательностью к свободным азидогруппам разветвленных конъюгатов олигонуклеотида T<sub>10</sub>. Блоки, несущие одну свободную азидо-группу прореагировали с 5'-алкин-модифицированным олигонуклеотидом **D11** (GGTCGCTTATCTGCACTCGGA) в тех же условиях, что и синтез исходных разветвленных конъюгатов (Схема 2).

Исследование продуктов реакции проводили в денатурирующем 15% ПААГ (Рис. 28). Формирование несимметричных гетерогенных блоков подтверждается появлением новой полосы мигрирующей медленнее, чем все полосы исходных олигонуклеотида и блоков.



**Рис. 28.** Анализ в 15% ПААГ реакционных смеси из синтеза несимметричных гетерогенных конъюгатов олигонуклеотидов T<sub>10</sub> и D11 с помощью клик-реакции с азидо-содержащими конъюгатами. (1) – клик реакция 21-мерного олигонуклеотида D11 с азидной группой дипродукта из триазида **7**, (2) – исходный дидипродукт, (3) – исходный D11, (4) – клик реакция D11 по азидной группе трипродукта из тетразида **85**, (5) – исходный трипродукт.

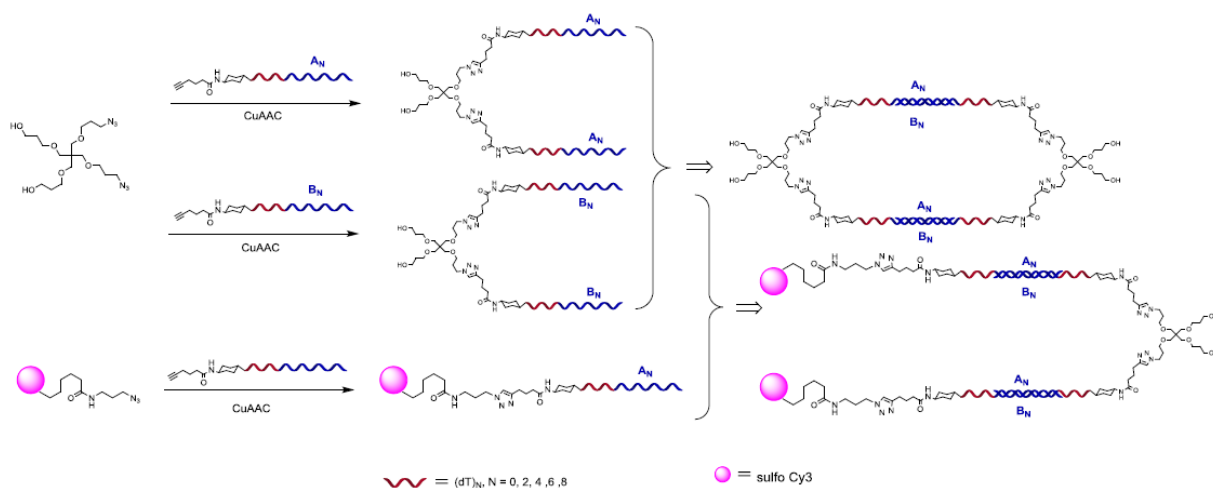
Получаемые несимметричные гетерогенные конъюгаты были разделены в денатурирующем ПААГ и очищены для дальнейшей характеристики с помощью масс-спектрометрии. Оценочный выход несимметричных гетерогенных блоков составляет 29% для конъюгата на основе триазида **84** и 9% для конъюгата из тетразида **85** после элюирования из геля. Конъюгаты имеют тетраэдрическую точку разветвления и

гидроксипропильные гибкие линкеры, делающие легкодоступными для гибридизации азидо-группы разветвляющихся реагентов.

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

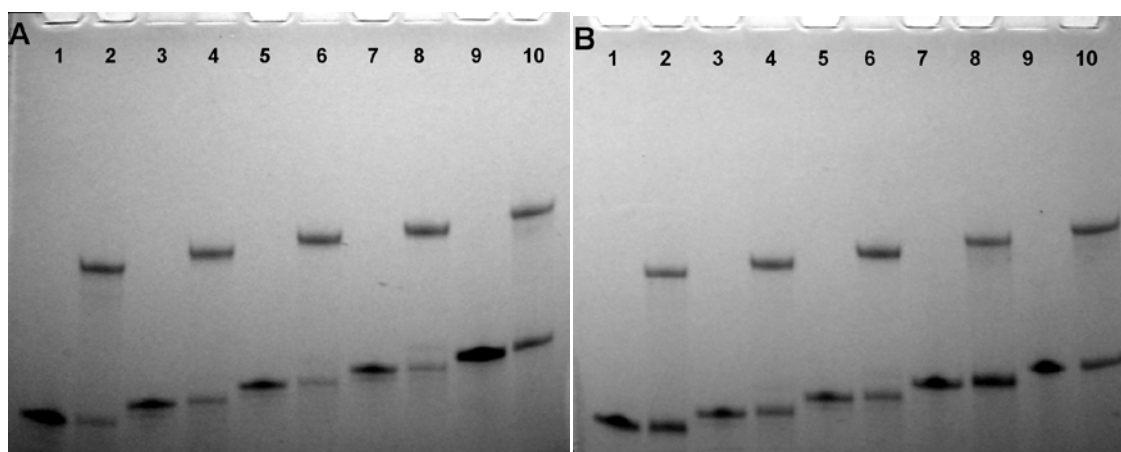
### 2.3. Гомогенные олигонуклеотидные конъюгаты из диазида и сборка простой наноструктуры на их основе

Для получения гомогенных олигонуклеотид-олигонуклеотидных конъюгатов на основе диазида **83** (Схема 3) были подобраны условия, позволяющие проводить клик-реакцию в высокой конверсии по двум азидогруппам.



**Схема 3.** Синтез конъюгатов на основе диазида **83** и их сборка в «нанозтилен»; гибридизация сульфо-Су3-меченых олигонуклеотидов с гомогенными конъюгатами на основе диазида **83**. Красным цветом выделена негибридируемая олиго-Т часть.

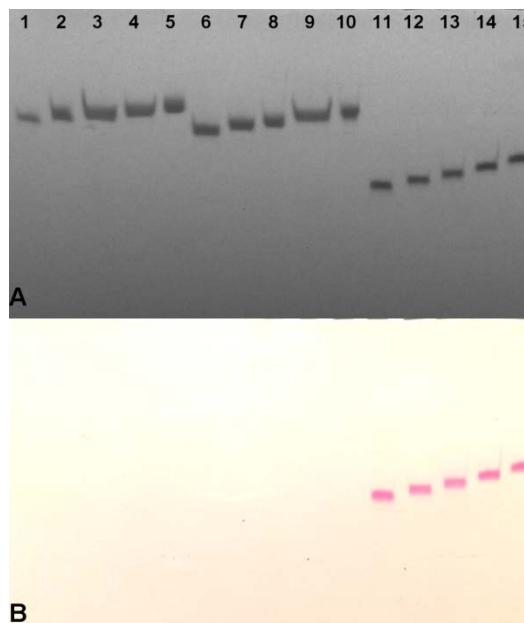
Оптимизированные условия клик-реакции (начальная концентрация алкин-модифицированного олигонуклеотида 200 мкМ, соотношение алкин : азид, 3 : 1, время реакции – 4 ч) позволяют получать гомогенные конъюгаты с высокой конверсией. Выходы выделенных конъюгатов составляли около 50% (в пересчете на исходный диазид) с полной конверсией азида. Аналитический электрофорез реакционных смесей показал отсутствие моно-модифицированных промежуточных продуктов (Рис. 29).



**Рис. 29.** Аналитический денатурирующий 14%-ный ПААГ реакционных смесей, (А) дорожки 1, 3, 5, 7, 9 – исходные алкин-модифицированные олигонуклеотиды (A1, A2, A3, A4, A5), дорожки 2, 4, 6, 8, 10 – реакционные смеси, содержащие продукты (A1)<sub>2</sub>, (A2)<sub>2</sub>, (A3)<sub>2</sub>, (A4)<sub>2</sub>, (A5)<sub>2</sub>; (Б) дорожки 1, 3, 5, 7, 9 – алкин-модифицированные олигонуклеотиды (B1, B2, B3, B4, B5), дорожки 2, 4, 6, 8, 10 – реакционные смеси, содержащие продукты (B1)<sub>2</sub>, (B2)<sub>2</sub>, (B3)<sub>2</sub>, (B4)<sub>2</sub>, (B5)<sub>2</sub>.

Кроме того, олигонуклеотиды A1, A2, A3, A4 и A5 были помечены по 5'-концу азидом красителя сульфо-Cy3 с помощью CuAAC (Схема 3, Экспериментальная часть, структура модификации).

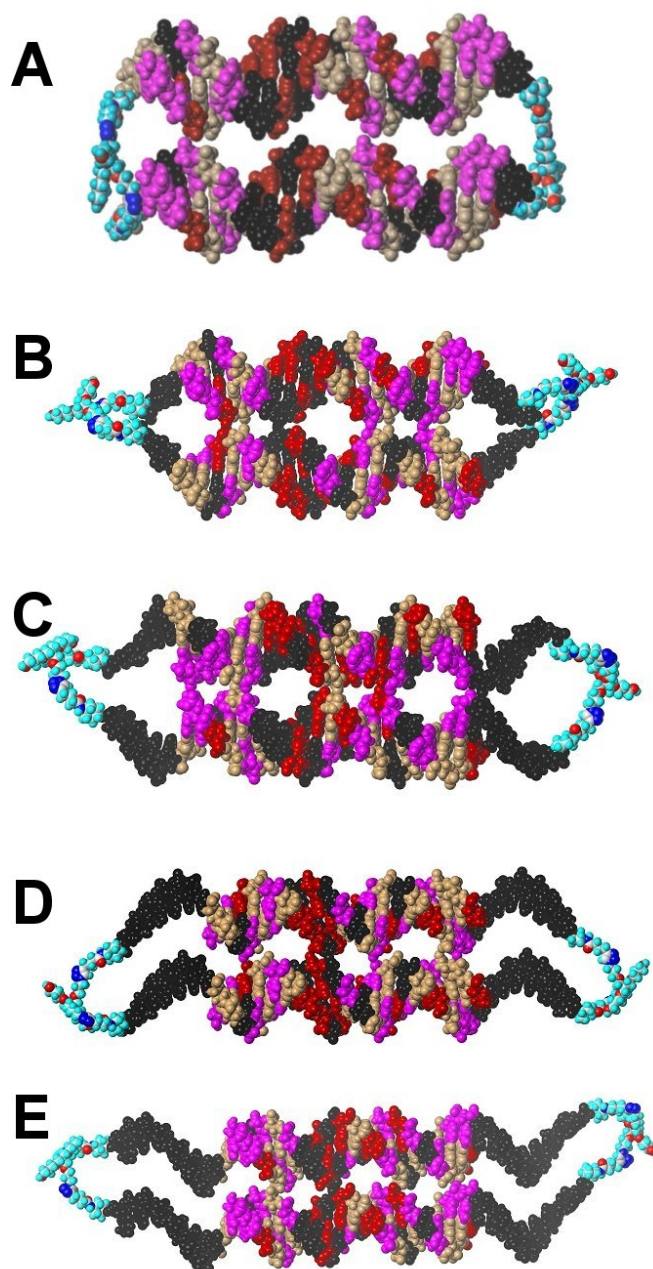
Денатурирующий электрофорез использовался также для препаративного выделения продуктов. Чистота и состав синтезированных конъюгатов, а также вспомогательных Cy3-меченых олигонуклеотидов были подтверждены с помощью ВЭЖХ, аналитического электрофореза в ПААГ (Рис. 30) и масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением (Экспериментальная часть, Приложение, Таблица 3).



**Рис. 30.** Аналитический денатурирующий электрофорез в 14%-ном ПААГ очищенных конъюгатов олигонуклеотид-олигонуклеотидных конъюгатов. (А) – Визуализация в УФ-области, дорожки с 1 по 10 содержат чистые конъюгаты (A1)<sub>2</sub>, (A2)<sub>2</sub>, (A3)<sub>2</sub>, (A4)<sub>2</sub>, (A5)<sub>2</sub>, (B1)<sub>2</sub>, (B2)<sub>2</sub>, (B3)<sub>2</sub>, (B4)<sub>2</sub>, (B5)<sub>2</sub>; дорожки 11–15 содержат меченные 5'-сульфо-Cy3-меченые олигонуклеотиды A1, A2, A3, A4, A5. (В) – Тот же гель в видимом свете, дорожки 11–15 содержат 5'-сульфо-Cy3- меченые олигонуклеотиды A1, A2, A3, A4, A5.

Синтез V-образных гомогенных конъюгатов (ОДН)<sub>2</sub> путем циклоприсоединения алкин-модифицированных олигонуклеотидов к диазиду **83** и их сборка в наноэтилен показаны на Схеме 3 и в Экспериментальной части.

Гибкость линкеров может сильно влиять на выход сборки ДНК-наноструктур, так как высокая жесткость в области точки ветвления может создавать стерические затруднения, в то время как увеличение гибкости может снизить селективность сборки. Для проверки возможности образования димеров типа «наноэтилен» выполнили молекулярное моделирование (Рис. 31) с визуализацией трехмерного расположения двухцепочечных фрагментов в димере типа (AN)<sub>2</sub>–(BN)<sub>2</sub>. Анализ моделей показал, что даже пара (A1)<sub>2</sub>–(B1)<sub>2</sub> с отсутствующими негибридирующимися линкерами T<sub>n</sub> может образовывать наноэтилен (Рис. 31А).



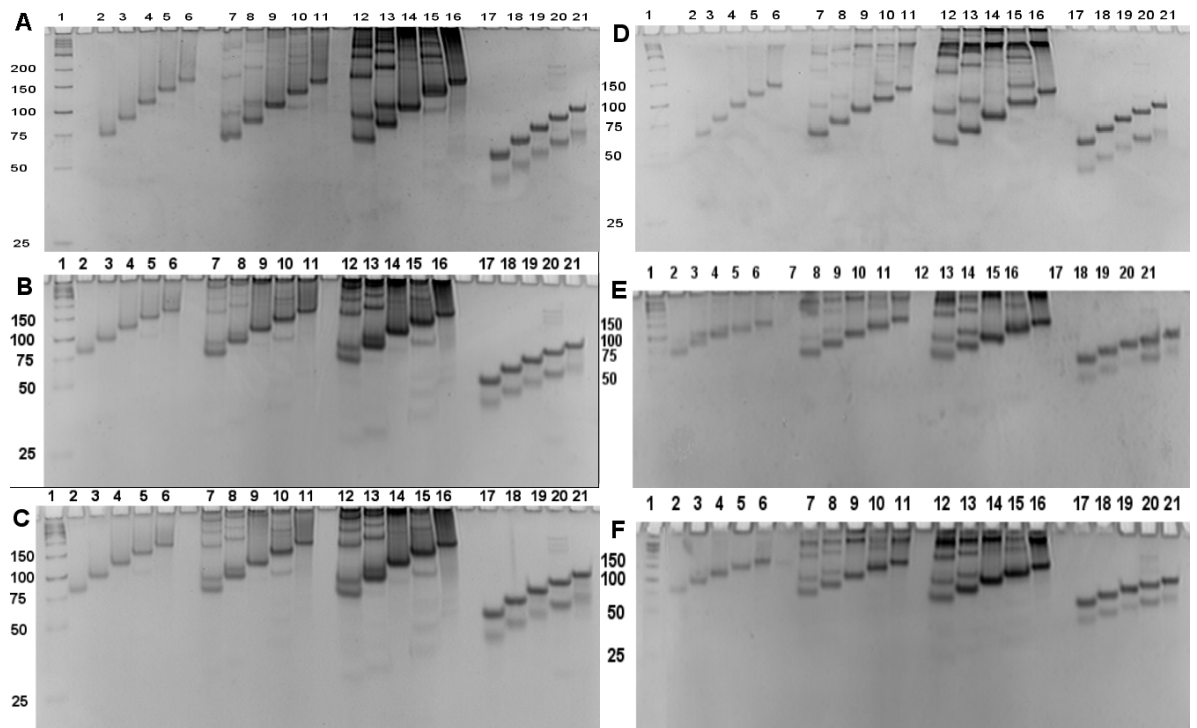
**Рис. 31.** Молекулярные модели ДНК-наноэтиленов: (А)  $(A1)_2-(B1)_2$ ; (В)  $(A2)_2-(B2)_2$ ; (С)  $(A3)_2-(B3)_2$ ; (D)  $(A4)_2-(B4)_2$ ; и (Е)  $(A5)_2-(B5)_2$ . Нуклеотиды: Т-черный, С-пурпурный, G-серый, А-красный; атомы в линкерах: сине-зеленый – водород, углеродные – белый, азот – синий, кислород – красный.

В димерной наноструктуре  $(A1)_2-(B1)_2$  (Рис. 31А) один из 1,2,3-триазолов участвует в  $\pi$ - $\pi$ -стэкинге с близлежащим остатком цитозина, а другой – с близлежащим остатком аденина на противоположной стороне наноструктуры. Оптимальная ориентация линкера и его длина предполагает существование только одного такого  $\pi$ - $\pi$ -взаимодействия на каждой стороне димера. Определена оптимальная ориентация линкера с относительным расположением двух спиралей ДНК, когда Y-оси пар нуклеотидов, прилегающих к линкеру с каждой стороны димера параллельны. Модель  $(A2)_2-(B2)_2$  показывает, что добавление линкера  $T_2$  в негибридизирующуюся часть возле линкера изменяет взаимное положение двух ДНК спирали. Две комплементарные пары нуклеотидов соединенные с

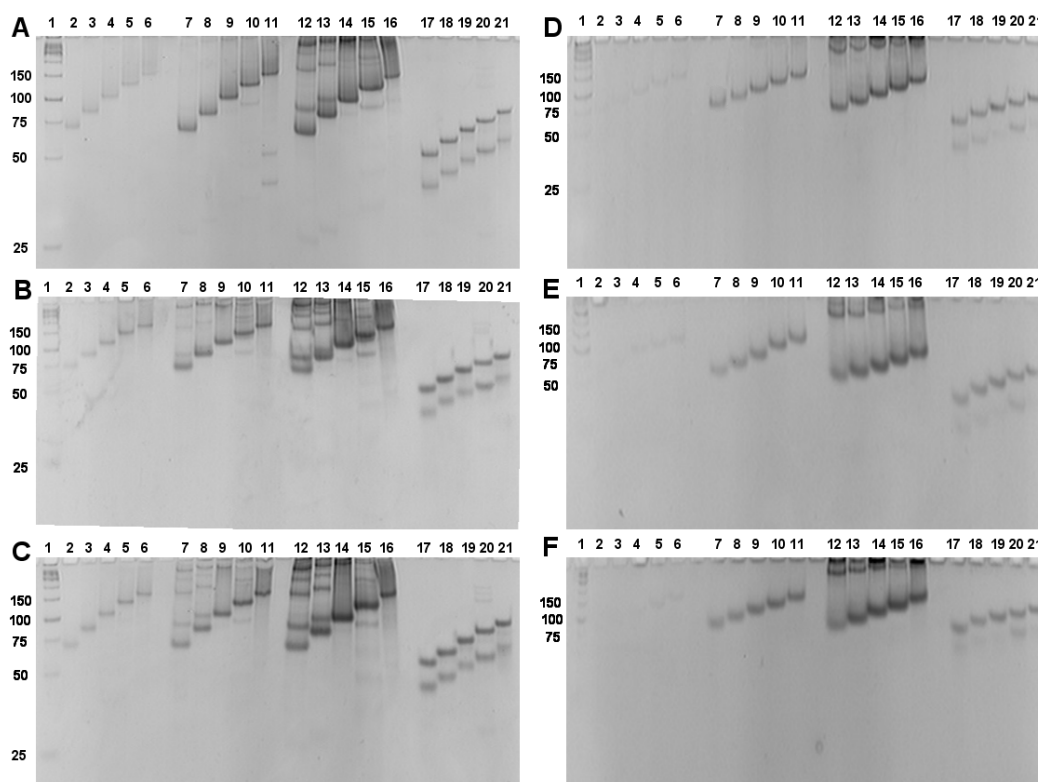


линкером, находятся ближе друг к другу из-за изменения угла между двумя Y-осями примерно на 90 градусов. Дальнейшее расширение моделей до T<sub>4</sub>, T<sub>6</sub> и T<sub>8</sub>. (Рисунки в Экспериментальной части) демонстрирует оптимальную ориентацию линкера путем вращения двух спиралей ДНК вокруг оси Z. Из-за повышенной гибкости, взаимные ориентации негибридирующихся концов могут быть одинаковыми (Рис. 31D,E) или разными (Рис. 31C).

Поскольку, исходя из моделирования, все эти наноструктуры могут быть стабильными, мы провели экспериментальное исследование по поиску оптимальных условий для сборки структур типа «наноэтилен». Оптимизированы условия реакции гибридизации варьированием состава буфера, скорости охлаждения и начальных концентраций V-образных блоков. Анализ электрофорезом в ПААГ гибридизационных смесей приведен на Рис. 32 и Рис. 33.



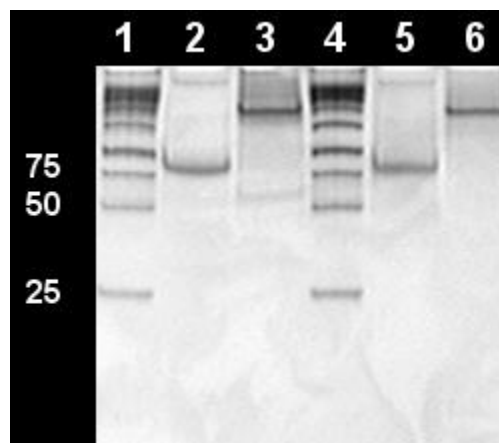
**Рис. 32.** Нативный аналитический электрофорез в 14% ПААГ реакций гибридизации. (А) – буфер ТАЕ, мгновенное охлаждение; (В) – буфер ТАЕ, градиентное охлаждение со скоростью 5°C/мин; (С) – буфер ТАЕ, градиентное охлаждение со скоростью 0.5°C/мин; (D) – буфер ТА-Mg, мгновенное охлаждение; (Е) – буфер ТА-Mg, градиентное охлаждение со скоростью 5°C/мин; (F) – буфер ТА-Mg, градиентное охлаждение со скоростью 0.5°C/мин. Дорожка 1 – Маркер молекулярной массы, дорожки 2–6: (A1)<sub>2</sub>–(B1)<sub>2</sub>, (A2)<sub>2</sub>–(B2)<sub>2</sub>, (A3)<sub>2</sub>–(B3)<sub>2</sub>, (A4)<sub>2</sub>–(B4)<sub>2</sub>, (A5)<sub>2</sub>–(B5)<sub>2</sub> в концентрациях 0.05 мкМ, дорожки 7–11: те же составы в концентрациях 0.5 мкМ, дорожки 12–16: те же составы в концентрациях 5 мкМ, дорожки 17–21: (B1)<sub>2</sub>–(Cy3-A1), (B2)<sub>2</sub>–(Cy3-A2), (B3)<sub>2</sub>–(Cy3-A3), (B4)<sub>2</sub>–(Cy3-A4), (B5)<sub>2</sub>–(Cy3-A5) при концентрации 0.5 мкМ.



**Рис. 33.** Аналитический нативный электрофорез в 14% ПААГ из реакций гибридизации. (А) – 1× буфер ТА ЭН, мгновенное охлаждение; (Б) – 1× буфер ТА ЭН, градиентное охлаждение при 5°C/мин; (В) – 1× буфер ТА ЭН, градиентное охлаждение со скоростью 0.5°C/мин; (D) – буфер MES EN, мгновенное охлаждение; (E) – буфер MES EN, градиентное охлаждение при 5°C/мин; (F) – буфер MES EN, градиентное охлаждение со скоростью 0.5°C/мин. Дорожка 1 – Маркер молекулярной массы, дорожки 2–6: (A1)<sub>2</sub>–(B1)<sub>2</sub>, (A2)<sub>2</sub>–(B2)<sub>2</sub>, (A3)<sub>2</sub>–(B3)<sub>2</sub>, (A4)<sub>2</sub>–(B4)<sub>2</sub>, (A5)<sub>2</sub>–(B5)<sub>2</sub> в концентрациях 0.05 мкМ, дорожки 7–11: те же составы в концентрациях 0.5 мкМ, дорожки 12–16: те же составы в концентрациях 5 мкМ, дорожки 17–21: (B1)<sub>2</sub>–(Cy3-A1), (B2)<sub>2</sub>–(Cy3-A2), (B3)<sub>2</sub>–(Cy3-A3), (B4)<sub>2</sub>–(Cy3-A4), (B5)<sub>2</sub>–(Cy3-A5) при концентрации 0.5 мкМ.

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

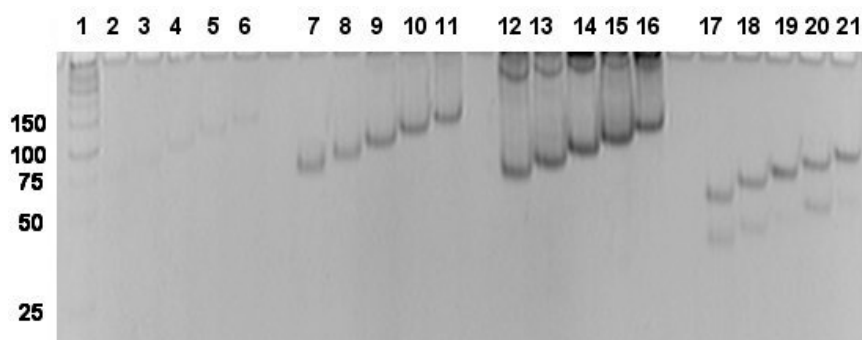
Также сравнили два диазида на основе тетраэтиленгликоля и пентаэритрита в качестве разветвляющих реагентов. Диазид на основе тетраэтиленгликоля **X** синтезировали по описанной методике [252]. Гибридизация V-образных конъюгатов на основе диазида **86** (N<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>, см. Эксп. часть) в оптимизированных условиях дали димеры (A1)<sub>2</sub>–(B1)<sub>2</sub> и (A5)<sub>2</sub>–(B5)<sub>2</sub> типа «наноэтилен», подобные производным диазида **83** (Рис. 33).



**Рис. 34.** Гибридизация V-блоков из диазидов **83** и **86** (Рис. 58, Экспериментальная часть). Аналитический нативный электрофорез в 14% ПААГ, реакции гибридизации в  $1\times$  буфер MES EN, мгновенное охлаждение, концентрация 0.5 мкМ. Дорожки 1,4 – маркеры молекулярной массы; конъюгаты диазида **6**, дорожки 2, 3 –  $(A1)_2-(B1)_2$ ,  $(A5)_2-(B5)_2$ ; конъюгаты диазида **86**, дорожки 5, 6 –  $(A1)_2-(B1)_2$ ,  $(A5)_2-(B5)_2$ .

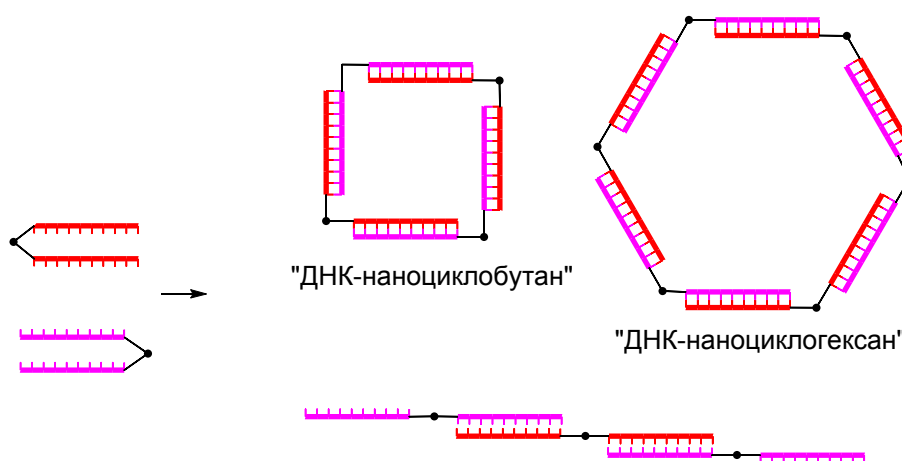
Однако в дальнейших исследованиях мы использовали диазид **83** на основе пентаэритрита с перспективой дальнейшей разработки блоков, полученных из аналогичных триазида **84** и тетразида **85** на основе пентаэритрита. Таким образом, разработанная система не зависит от длины и гибкости линкеров  $T_n$  в V-блоках.

Состав буфера сильно влияет на формирование дискретных наноструктур из V-блоков. Магнийсодержащий буфер TA-Mg, в отличие от своего контрольного антипода TAE (с EDTA) привел к превосходной стабилизации образующихся структур при нативном электрофорезе в ПААГ. Набор наноструктур в реакционных смесях практически не отличался при использовании трис-ацетатных буферов с магнием и EDTA. Кислый буфер, содержащий морфолинэтансульфо кислоту и этилендиамин (MES-EN) показал значительное отличие в гомогенности для всех вариантов гибридизаций. Добавление этилендиамина в качестве имитации  $Mg^{2+}$  в буфере MES сильно повлияло на образование основных димерных продуктов при исходных концентрациях 0.5 и 5 мкМ (Рис. 35).



**Рис. 35.** Аналитический нативный электрофорез в 14% ПААГ реакций гибридизации. Буфер MES-EN, мгновенное охлаждение; дорожка 1 – маркер молекулярной массы, полосы 2–6:  $(A1)_2-(B1)_2$ ,  $(A2)_2-(B2)_2$ ,  $(A3)_2-(B3)_2$ ,  $(A4)_2-(B4)_2$ , и  $(A5)_2-(B5)_2$  в концентрации 0.05 мкМ, дорожки 7-11: то же композиции в концентрациях 0.5 мкМ, дорожки 12-16: то же композиции в концентрации 5 мкМ, дорожки 17–21:  $(B1)_2-(Cu3-A1)$ ,  $(B2)_2-(Cu3-A2)$ ,  $(B3)_2-(Cu3-A3)$ ,  $(B4)_2-(Cu3-A4)$  и  $(B5)_2-(Cu3-A5)$  в концентрации 0.5 мкМ.

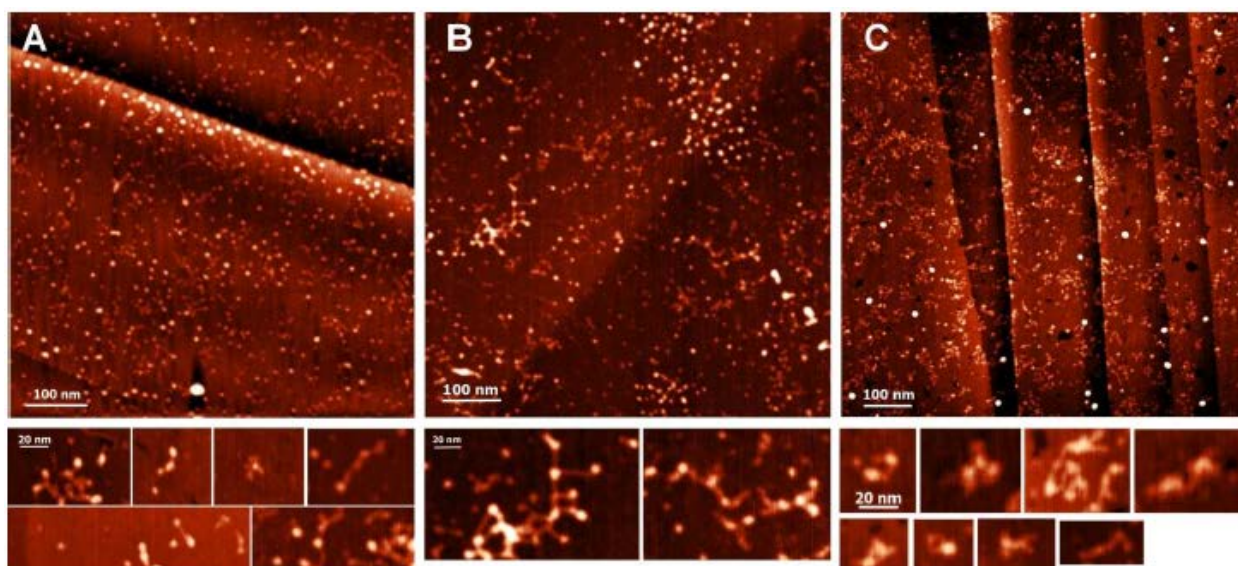
Однако использование буфера MES-EN при низкой концентрации (0.05 мкМ) начальных V-образных блоков приводило к неудовлетворительному формированию каких-либо наноструктур ДНК. Наиболее значимым параметром, влияющим на гибридизацию оказалась начальная концентрация V-образных олигонуклеотидных конъюгатов. Более низкие концентрации в основном приводили к образованию единственного продукта – димера типа «наноэтилен». Однако, увеличение концентрации до 0.5 или 5 мкМ приводит к формированию более сложных дискретных структур с более медленными миграционными подвижностями на электрофорезе. Структуры более высокого порядка не были целью данной работы, поэтому они не выделялись и не изучались. Предположительно, происходит формирование дискретных циклических конструкций типа «наноциклобутан», «наноциклогексан» и т. д. (Рис. 36).



**Рис. 36.** Возможные дискретные ДНК-наноструктуры из олигомеризации двух блоков с двумя комплементарными олигонуклеотидами.

Продукты гибридизации конъюгатов  $(A5)_2$  и  $(B5)_2$  в различных буферах исследовали с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ) (Рис. 37). АСМ выполнялась на поверхности атомарно ровного графита, модифицированного

производным олигоглицина. Характерные изображения, наблюдаемые в трис-ацетатном буфере с разными концентрациями ионов  $Mg^{2+}$ , состояли из мелких глобулярных структур и более сложных и разветвленных сетчатых агломератов. Увеличение концентрации  $Mg^{2+}$  приводит к образованию разветвленных высокомолекулярных неупорядоченных структур. В первом случае (Рис. 37А) отсутствие ионов магния в буфере способствует предпочтительному формированию дискретных гантелеобразных структур, во втором случае (Рис. 37В) добавление в буфер 1 мМ ионов  $Mg^{2+}$  приводит к образованию более разветвленных структур. В третьем случае (Рис. 37С) 50 мМ концентрация ионов магния увеличивает количество высокомолекулярных неупорядоченных структур. В целом, однозначная визуализация таких небольших димеров с помощью АСМ – трудная задача, так как на поверхности модифицированного графита возможно сильное искажение наблюдаемых структур.



**Рис. 37.** Атомно-силовая микроскопия самоорганизующихся наноструктур, полученных гибридизацией эквимольных количеств  $(A5)_2$  и  $(B5)_2$  в различных буферах. Подложка – атомарно ровная поверхность модифицированного графита. Исходная концентрация V-образных блоков – 0.5 мкМ, мгновенное охлаждение: (А) – 1× буфер ТАЕ; (Б) – 1× буфер ТА Mg; (В) – 1× ТА Mg, 50 мМ  $Mg^{2+}$ .

## 2.4. Наномомеры для сборки динамических ДНК-наноструктур

По аналогии со сборкой дискретных структур более высокого порядка при высоких концентрациях разветвленных конъюгатов, мы предложили перегибридизацию по механизму замещения последовательности в качестве альтернативного контролируемого способа синтеза более сложных структур (Рис. 38).

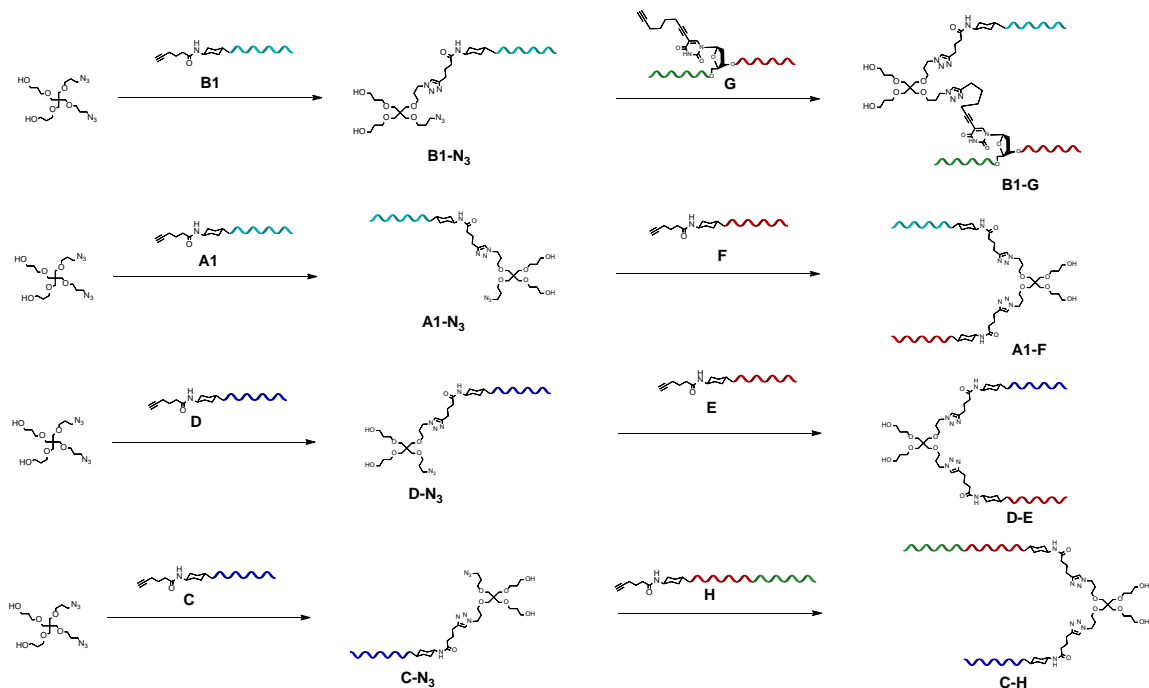


Рис. 38. Ступенчатый синтез гетерогенных V-блоков.

Для синтеза несимметричных гетерогенных V-образных конъюгатов мы выполнили поэтапное присоединение двух разных олигонуклеотидов к реагенту разветвления **83**, используя клик-реакцию CuAAC с образованием несимметричных димеров B1-G, A1-F, D-E, C-H (Рис. 38).

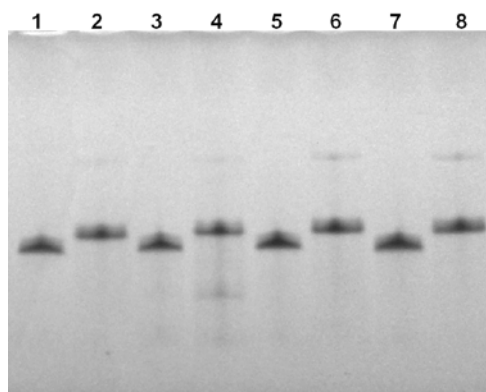
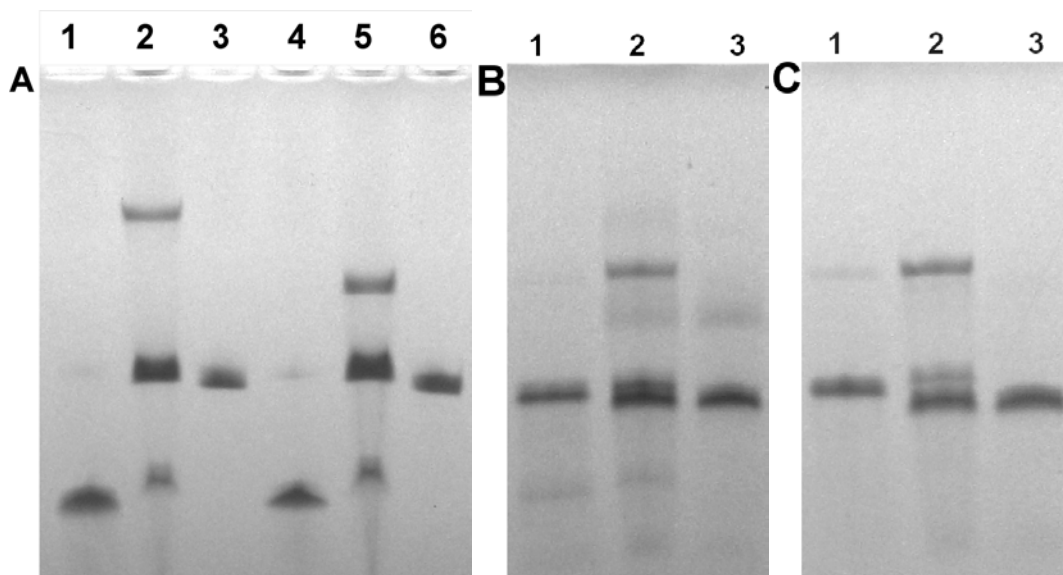


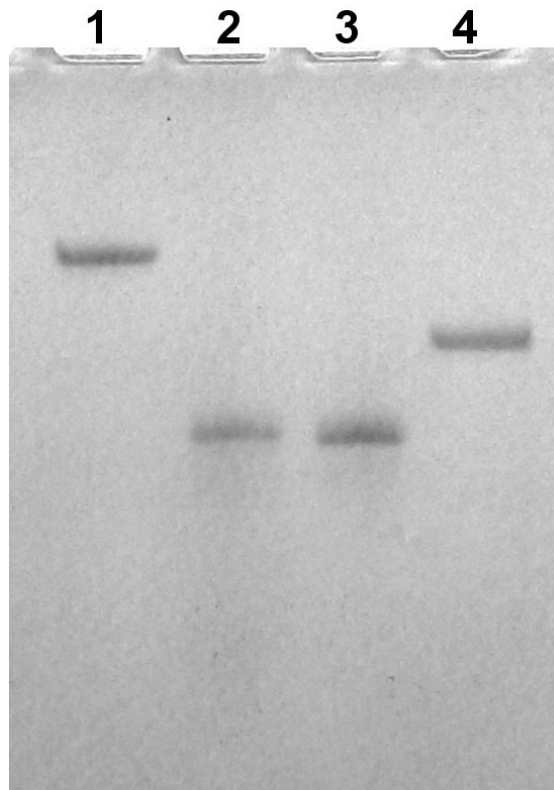
Рис. 39. Реакция алкин-модифицированных олигонуклеотидов с избытком диазида **83**. Аналитический денатурирующий 14%-ный ПААГ реакционных смесей, дорожки 1, 3, 5, 7 – исходные алкин-модифицированные олигонуклеотиды (B1, A1, D, C); дорожки 2, 4, 6, 8 – реакционные смеси, содержащие моноаддукты диазида **83** с олигонуклеотидами B1, A1, D, C.

После выделения полученных моноаддуктов олигонуклеотидов В1, А1, D, С с диазидом **83** (Рис. 39), была проведена следующая клик-реакция для введения в состав моно-производных вторых последовательностей олигонуклеотидов (Рис. 40).



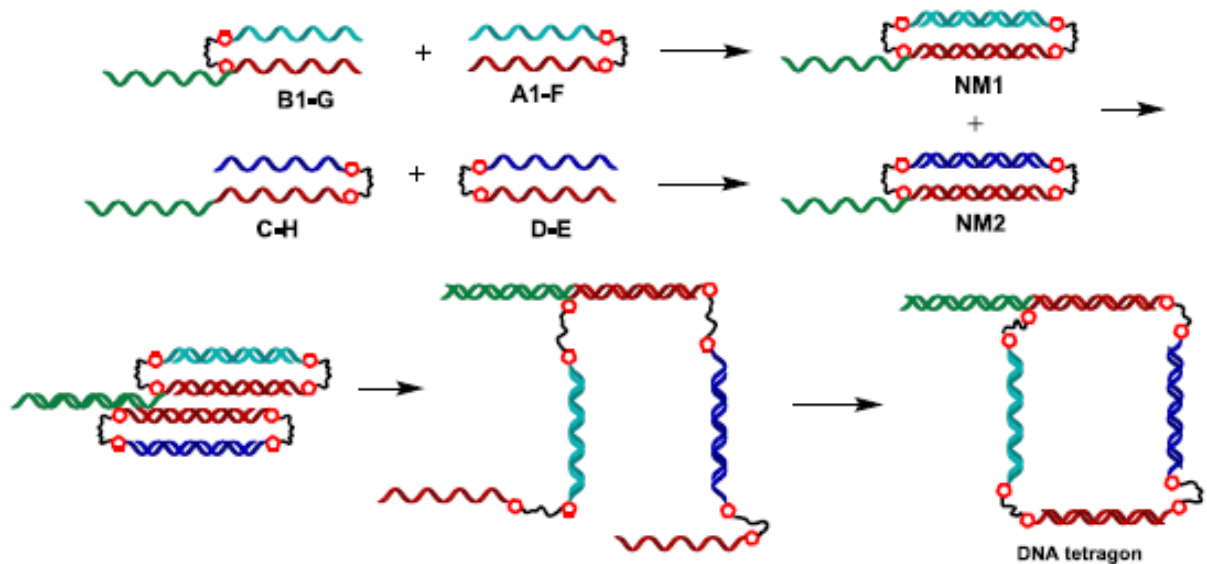
**Рис. 40.** Аналитический денатурирующий электрофорез в 14% ПААГ реакционных смесей. (А) дорожки: 1 – моноаддукт U11 и диазида **83**, 2 – моноаддукт В1 и диазида **6**, прореагировавший с олигонуклеотидом G, 3 – олигонуклеотид G, 4 – моноаддукт олигонуклеотида С и диазида **83**, 5 – реакция моноаддукта С и диазид **6** с олигонуклеотидом H, 6 – олигонуклеотидом H; (Б) дорожки: 1 – продукт клик-реакции между олигонуклеотидом А1 и диазидом **83**, 2 – моноаддукт А1 и диазида **6**, прореагировавший с олигонуклеотидом F, 3 – олигонуклеотид F; (В) дорожки: 1 – продукт клик-реакции между олигонуклеотидом D и диазидом **83**, 2 – моноаддукт D и диазида **83**, прореагировавший с олигонуклеотидом E, 3 – олигонуклеотид E.

Выделение и очистка гетерогенных разветвленных конъюгатов с диазидом **83** проводилась с помощью денатурирующего электрофореза в ПААГ. Анализ и подтверждение полученных структур проводили с помощью ВЭЖХ-МС. На Рис. 41 показана картина аналитического денатурирующего электрофореза очищенных гетерогенных конъюгатов с диазидом **83**.



**Рис. 41.** Денатурирующий 14% ПААГ очищенных гетерогенных несимметричных V-образных блоков **B1-G**, **A1-F**, **D-E**, **C-H** (дорожки 1–4 соответственно).

Гибридизация V-образных блоков **B1-G** и **A1-F**, **D-E** и **C-H** в отработанных ранее условиях приводила к образованию двух димерных дискретных наноструктуры - **NM1** и **NM2**, соответственно (Рис. 42).



**Рис. 42.** Синтез «наномомеров» **NM1** и **NM2** и их спонтанная гибридационная перегруппировка, опосредованная адаптером, с образованием ДНК – «нанометилциклобутана».

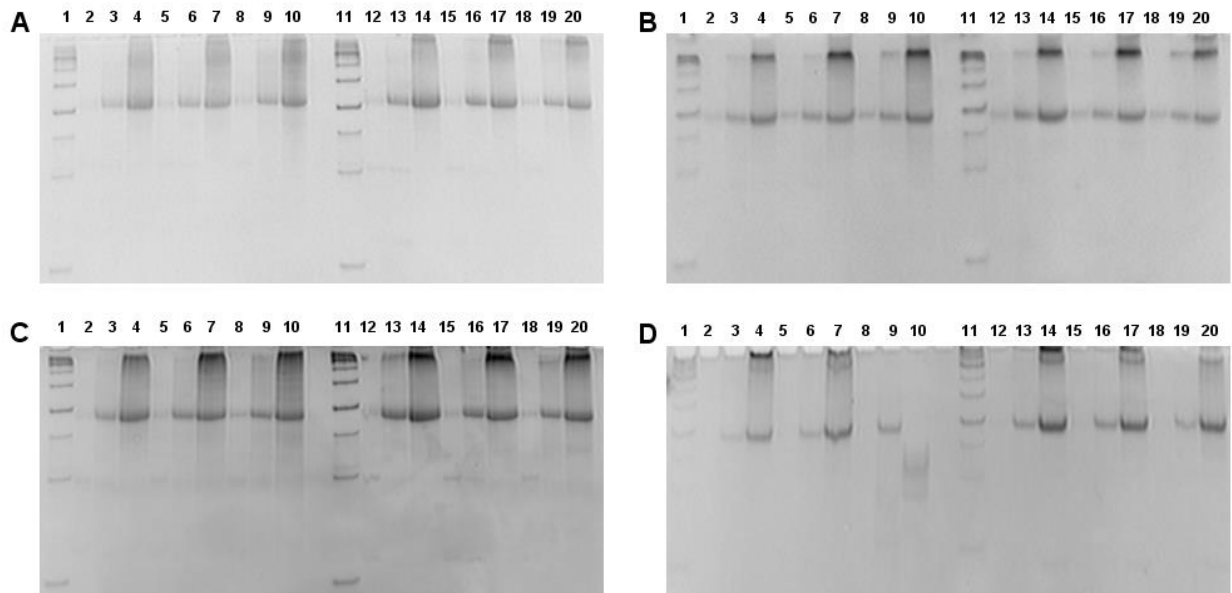
В Таблице 1 приведены масс-спектрометрические данные всех очищенных гетерогенных V-образных конъюгатов. Полученные массы соответствуют расчетам.



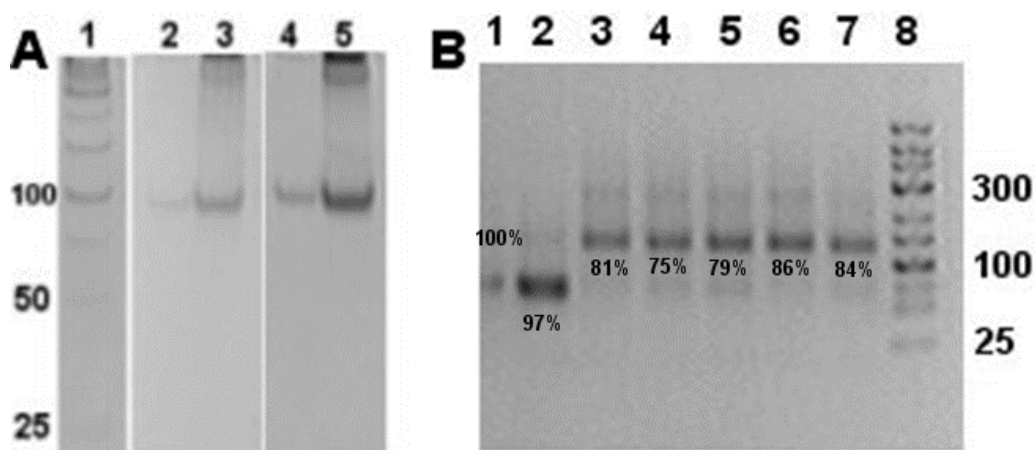
**Таблица 1.** Состав и данные МС синтезированного несимметричного олигонуклеотида-олигонуклеотида V-образной формы. конъюгаты

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

Оптимальные условия для сборки двух наномомеров **NM1** и **NM2** были такими: мгновенное охлаждение в буфере MES EN, 0.5 мкМ начальная концентрация V-образных блоков (Рис. 43 и Рис. 44).

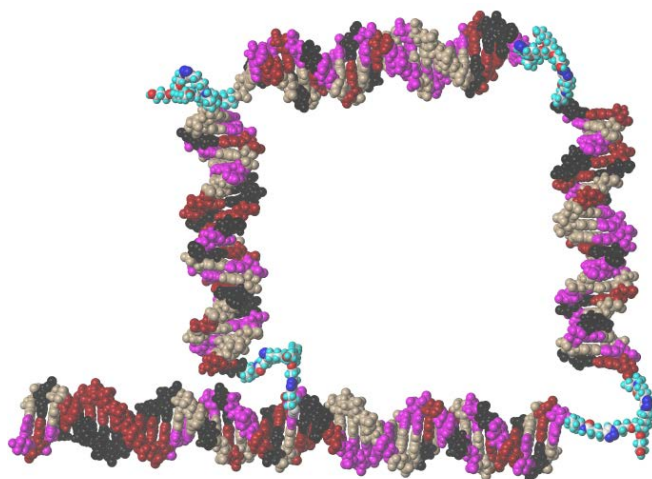


**Рис. 43.** Аналитический ПААГ реакций гибридизации с образованием димеров **NM1** и **NM2** в буферах: (A) –  $1 \times$  TAE, (B) –  $1 \times$  TA Mg, (B) –  $1 \times$  TA EN, (D) –  $1 \times$  MES EN. Дорожки: 1 – Маркер молекулярной массы; 2 – **NM1**, мгновенное охлаждение, 0.05 мкМ; 3 – **NM1**, мгновенное охлаждение, 0.5 мкМ; 4 – **NM1**, мгновенное охлаждение, 5 мкМ; 5 – **NM1**, градиентное охлаждение при  $5^\circ\text{C}/\text{мин}$ , 0.05 мкМ; 6 – **NM1**, градиентное охлаждение при  $5^\circ\text{C}/\text{мин}$ , 0.5 мкМ; 7 – **NM1**, градиентное охлаждение при температуре не менее  $5^\circ\text{C}/\text{мин}$ , 5 мкМ; 8 – **NM1**, градиентное охлаждение  $0.5^\circ\text{C}/\text{мин}$ , 0.05 мкМ; 9 – **NM1**, градиентное охлаждение при  $0.5^\circ\text{C}/\text{мин}$ , 0.5 мкМ; 10 – **NM1**, градиентное охлаждение  $0.5^\circ\text{C}/\text{мин}$ , 5 мкМ; 11 – Маркер молекулярной массы; 12 – **NM2**, мгновенное охлаждение – 0.05 мкМ; 13 – **NM2**, мгновенное охлаждение, 0.5 мкМ; 14 – **NM2**, мгновенное охлаждение, 5 мкМ; 15 – **NM2**, градиентное охлаждение при  $5^\circ\text{C}/\text{мин}$ , 0.05 мкМ; 16 – **NM2**, градиентное охлаждение при  $5^\circ\text{C}/\text{мин}$ , 0.5 мкМ; 17 – **NM2**, градиентное охлаждение при  $5^\circ\text{C}/\text{мин}$ , 5 мкМ; 18 – **NM2**, градиентное охлаждение  $0.5^\circ\text{C}/\text{мин}$ , 0.05 мкМ; 19 – **NM2**, градиентное охлаждение при  $0.5^\circ\text{C}/\text{мин}$ , 0.5 мкМ; 20 – **NM2**, градиентное охлаждение  $0.5^\circ\text{C}/\text{мин}$ , 5 мкМ.



**Рис. 44.** (А) Сборка наномономеров **NM1** и **NM2**; Аналитический электрофорез в ПААГ,  $1\times$  MES EN. Дорожки: 1 – Маркер молекулярной массы; 2 – **NM1**, мгновенное охлаждение, 0.5 мкМ; 3 – **NM1**, мгновенное охлаждение, 5 мкМ; 4 – **NM2**, мгновенное охлаждение, 0.5 мкМ; 5 – **NM2**, мгновенное охлаждение, 5 мкМ; (В) индуцированная смещением цепи перегруппировка в циклическую тетрамерную структуру, электрофорез в 3% агарозном геле. Наномомеры собраны в буфере MES EN (дорожка 1 – **NM1**; 2 – **NM2**); смесь предварительно собранных наномономеров **NM1** и **NM2** (дорожка 3 – MES EN; 4 – TAE; 5 – TA EN; 6 – TA Mg; 7 – TA Ni), дорожка 8 – маркер молекулярной массы; Плотность полос на гелях анализировали с помощью ImageJ.

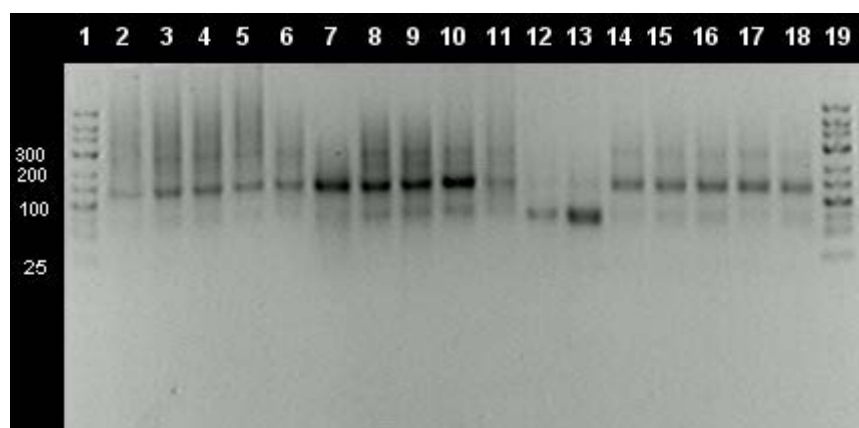
Молекулярное моделирование тетрамерного продукта из наномономеров **NM1** и **NM2** показало, что длина линкера предотвращает деформации валентных и двугранных углов как в структуре линкера, так и сахарофосфатного остова в двухцепочечных фрагментах ДНК (Рис. 45).



**Рис. 45.** Молекулярная модель основного продукта, полученного в наномасштабной реакции «наномономеров» **NM1** и **NM2**. Нуклеотиды: Т – черный, С – пурпурный, G – серый, А – красный; атомы в линкерах: водород – сине-зеленый, углерод – белый, азот – синий, кислород – красный.

Чтобы исследовать влияние порядка смешивания компонентов опробовали три способа смешивания. В первом эксперименте четыре гетерогенных V-образных блока (**B1-G**, **A1-F**, **D-E**, **C-H**) смешивали одновременно в различных буферах либо при комнатной температуре (Рис. 46, дорожки 2–6), либо при нагреве и последующем охлаждении

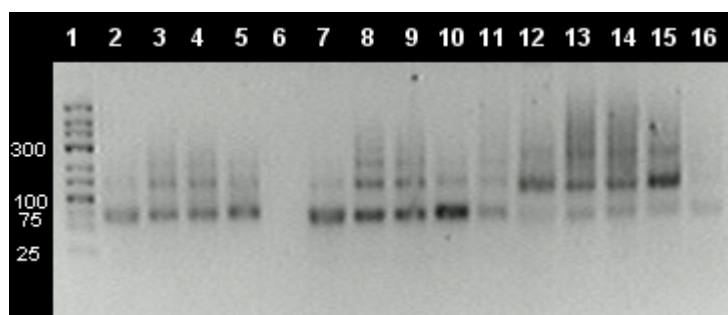
(Рис. 46, дорожки 7–11), для образования циклического тетрамера и циклических олигомеров более высоких порядков.



**Рис. 46.** Аналитический 3%-ный электрофорез в агарозном геле реакции сополимеризации ДНК. Дорожки 1, 19 – маркер молекулярной массы; смесь B1-G, A1-F, D-E, C-H при комнатной температуре без нагрева (дорожка 2 – MES EN; 3 – TAE; 4 – TA EN; 5 – TA-Mg; 6 – TA-Ni); смесь B1-G, A1-F, D-E, C-H после нагревания до 95°C (дорожка 7 – MES EN; 8 – TAE; 9 – TA EN; 10 – TA-Mg; 11 – TA-Ni); наномомеры, собранные в буфере MES EN (дорожка 12 – NM1; 13 – NM2); смесь предварительно собранных наномомеров NM1 и NM2 (дорожка 14 – MES EN; 15 – TAE; 16 – TA EN; 17 – TA Mg; 18 – TA Ni).

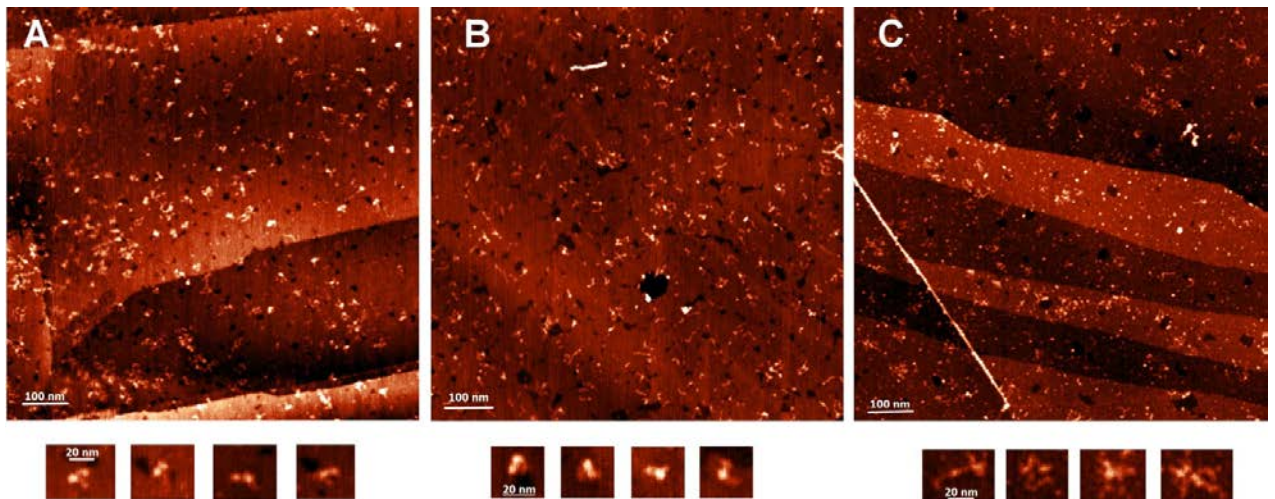
Вторая процедура заключалась в смешивании двух предварительно организованных наномомеров NM1 и NM2 (Рис. 46, дорожки 12-13) в буфере MES. NM1 и NM2 были получены из двух пар гетерогенных V-образных блоков: (B1-G)+(A1-F), (D-E)+(C-H). Гибридизация двух наномомеров, обладающих липкими концами в различных буферах при комнатной температуре привела к высокому выходу тетрамерного циклического продукта с незначительными количествами тяжелых побочных продуктов (Рис. 46, дорожки 14–18).

Третья процедура основана на сборке наномомеров NM1 (Рис. 47, дорожки 2–6) и NM2 (Рис. 47, дорожки 7–11) в разных пробирках. Затем наномомеры были объединены, образуя тетрамер вместе с примесями более высокого порядка (Рис. 47, дорожки 12–16).



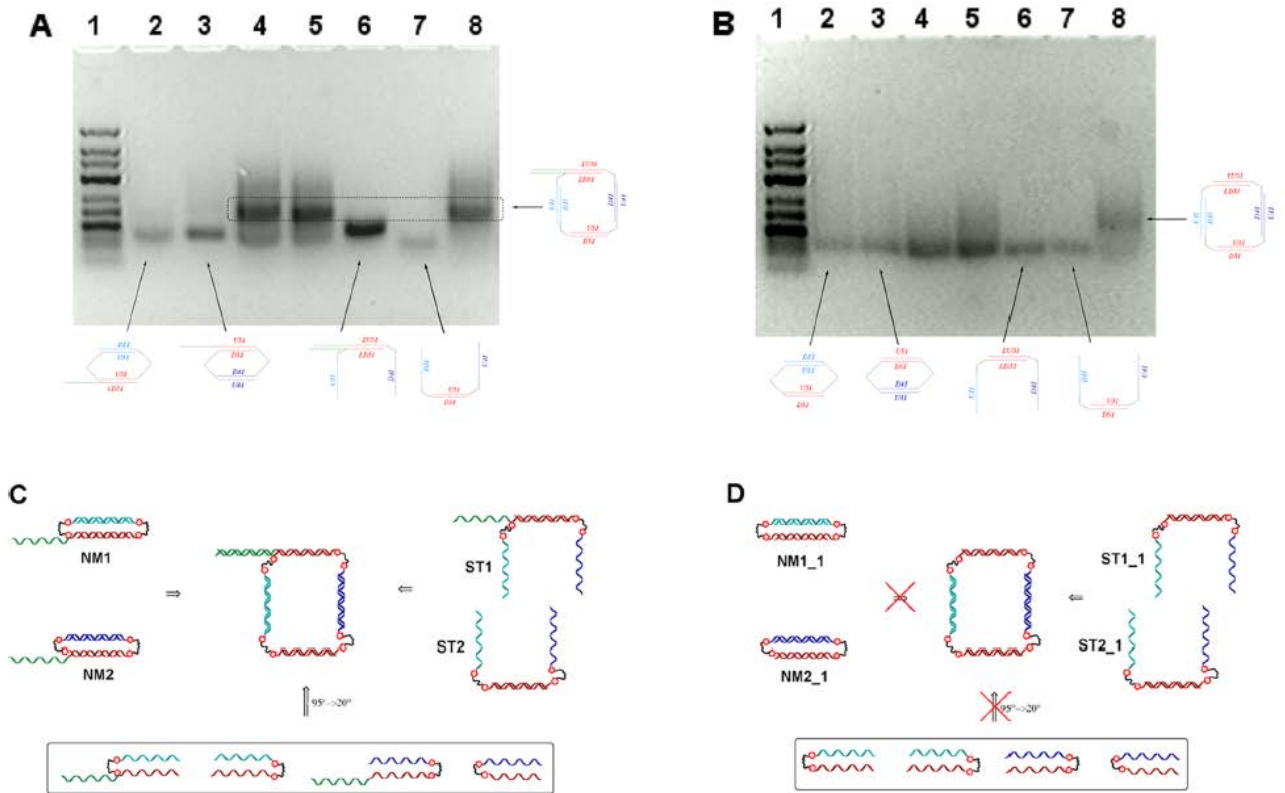
**Рис. 47.** Аналитический 3%-ный электрофорез в агарозном геле реакции сополимеризации ДНК. Дорожка 1 – маркер молекулярной массы; предварительно собранный наномономер NM1 (дорожка 2 – MES EN; 3 – TAE; 4 – TA EN; 5 – TA-Mg; 6 – TA-Ni) и NM2 (дорожка 7 – MES EN; 8 – TAE; 9 – TA EN; 10 – TA-Mg 11 – TA-Ni); смесь наномомеров NM1 и NM2 (12 – MES EN; 13 – TAE; 14 – TA EN; 15 – TA-Mg; 16 – TA-Ni).

Наномомеры **NM1** и **NM2**, а также их продукт гибридизации ДНК-тетрамер, были изучены с помощью АСМ (Рис. 48). Морфологию наномомеров **NM1** и **NM2** исследовали в буфере MES-EN, который подходит для АСМ-анализа небольших димерных наноструктур типа «наноэтилен». Трис-ацетатный буфер (с ионами  $Mg^{2+}$  или без них) оказал влияние на форму димерных структур. Наблюдаемые структуры (**NM1** и **NM2**) состоят из доменов, похожих на гантели. Типичные домены (Рис. 48А,В) были 7–8 нм в длину и 0,5–1 нм в высоту, что соответствует размеру исходных олигонуклеотидов E, C, F, D, B1 и A1. Более детальное исследование формы также показало наличие одноцепочечных фрагментов в наномомерах. Изображение полученной смеси (**NM1** + **NM2**, Рис. 48С) показало ожидаемые сложные сетчатые разветвленные структуры представляющий собой продукт перегруппировки двух наномомеров в тетрамерный продукт и высшие олигомеры.



**Рис. 48.** Атомно-силовая микроскопия продуктов гибридизации; (А) синтез **NM1** из **B1-G** и **A1-F**; (В) синтез **NM2** из **D-E** и **C-H** (0.5 мкМ, мгновенное охлаждение,  $1\times$  MES EN); (С) гибридизация **NM1** и **NM2** (оба 0.25 мкМ). Подложка: модифицированный графит.

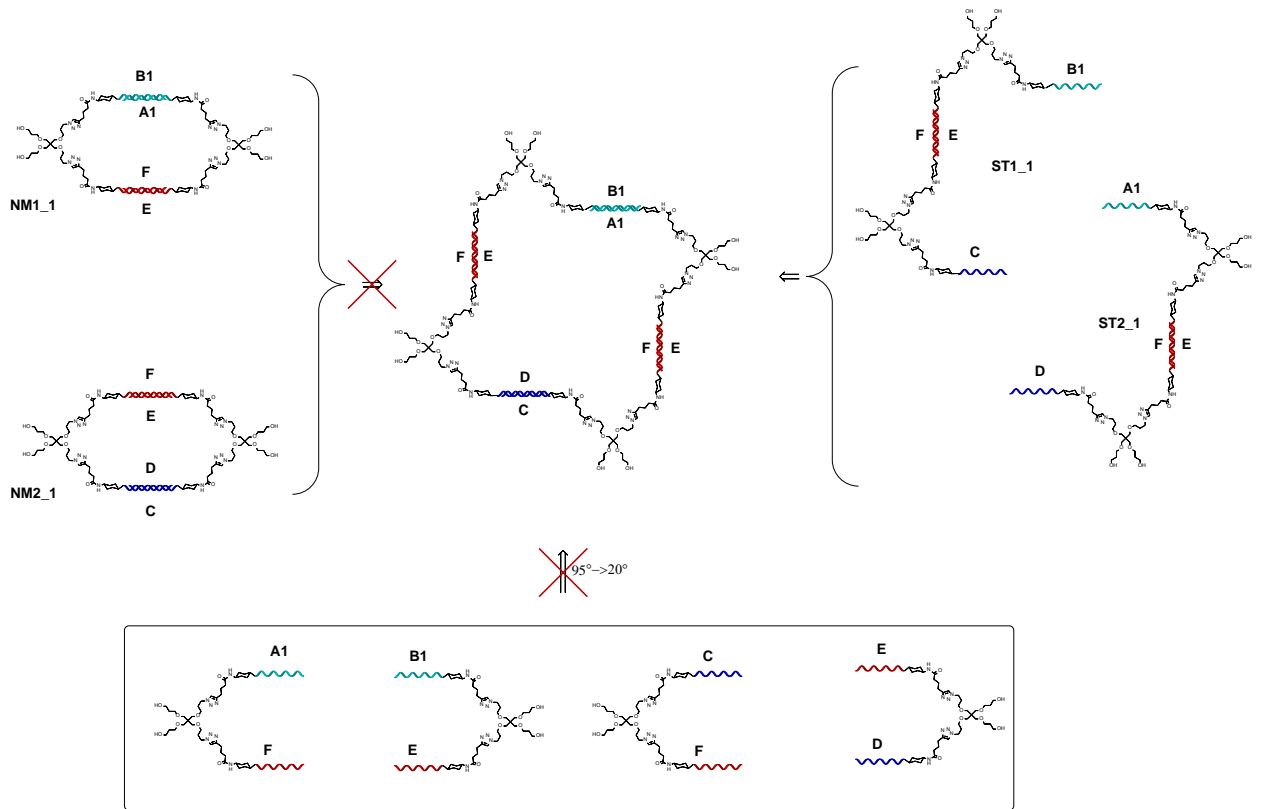
Чтобы доказать решающую роль одноцепочечного фрагмента в наномомере при сборке компактного и дискретного ДНК-тетрагона из двух димеров типа наноэтилена, мы провели эксперимент с использованием усеченных версий строительных блоков **NM1** и **NM2**. Несколько возможных путей сборки тетрамера показаны на Рис. 49.



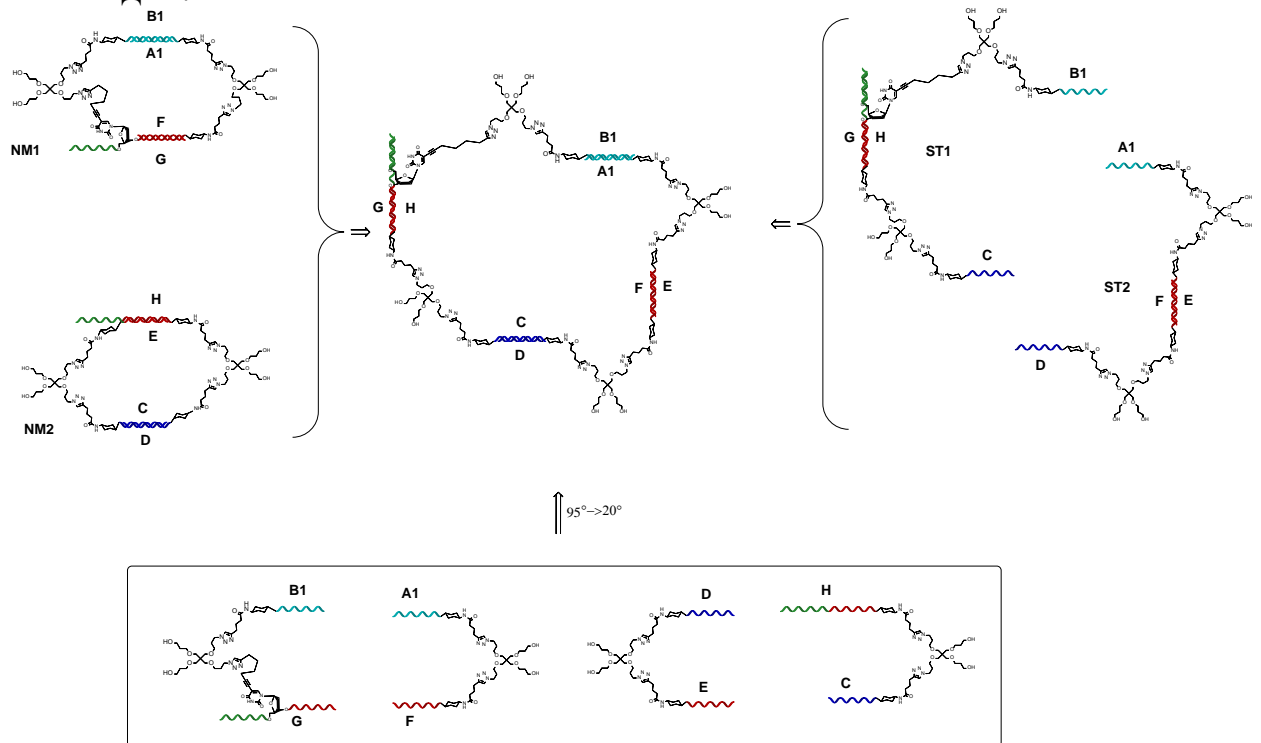
**Рис. 49.** (А) Электрофорез в 3% агарозном геле. (А) Дорожка 1 – маркер молекулярной массы; наномомеры, собранные в буфере MES EN (дорожка 2 – **NM1**; 3 – **NM2**); смесь предварительно собранных наномомеров **NM1** и **NM2** в MES EN (дорожка 4); смесь V-образных блоков B1-G, A1-F, D-E, и C-H после нагревания и охлаждения (дорожка 5); предварительно собранный полуквадрат **ST1** (дорожка 6); предварительно собранный полуквадрат **ST2** (дорожка 7), смесь предварительно собранных полуквадратов **ST1** и **ST2** (дорожка 8). (В) дорожка 1 – маркер молекулярной массы; наномомеры, собранные в буфере MES EN (дорожка 2 – **NM1\_1**; 3 – **NM2\_2**); смесь предварительно собранных наномомеров **NM1\_1** и **NM2\_1** в MES EN (дорожка 4); смесь V-образных блоков A1-F, B1- E, C-F и D-E после нагревания и охлаждения (дорожка 5); предварительно собранный полуквадрат **ST1\_1** (дорожка 6); полуквадрат **ST1\_2** в собранном виде (дорожка 7), смесь предварительно собранных полуквадратов **ST1\_1** и **ST2\_1** (дорожка 8). (В) Доказательство сборки тетрагона ДНК, направленной на опору. (С) Сборка тетрагональных наноструктур без валентного одноцепочечного промотора ДНК.

Гибридизация блоков, модифицированных одноцепочечным олигонуклеотидом (Рис. 49А, дорожка 4 и Рис. 50) дала эффективную сборку тетрамера из наномомеров, тогда как использование простых наноэтиленов не привело к образованию димеров (Рис. 49В, дорожка 4 и Рис. 51).

Единственный способ получить простой четырехугольник (Рис. 50) — это ступенчатая гибридизация V-образных блоков в два «полуквадрата», которые подвергаются дальнейшей гибридизации (Рис. 49В, дорожка 8). Ни гибридизация двух наноэтиленов **NM1\_1** и **NM2\_1**, ни прямая гибридизация четырех гетерогенных V-образных блоков дали желаемый тетрамер (Рис. 49В, дорожки 4 и 5).



**Рис. 50.** Сборка тетрагональных ДНК-наноструктур без валентного промотора одноцепочечной ДНК.



**Рис. 51.** Доказательство сборки тетрамера по механизму замещения последовательности.

Таким образом, одноцепочечный фрагмент важен для правильной гибридизации наномономеров или одновременной гибридизации четырех V-образных конъюгатов ДНК (Рис. 51).

## 2.5. Олигонуклеотидные конъюгаты, содержащие разветвлённые кластеры N-ацетилгалактозамина

В случае получения азидных производных олигонуклеотидов необходимо соблюдать опеределенные меры предосторожности во время синтеза, поскольку азидные фосфорамидиты вступают в реакцию Штаудингера в ацетонитриле, что приводит к их деградации [218,221,253]. Можно избежать их деградации, иммобилизовав азидные производные на твердофазных носителях, или используя раствор азидного фосфорамидита в дихлорметане. Кроме того, конъюгация в растворе трудно применима к гидрофобным молекулам из-за их плохой растворимости в воде или в водноорганических смесях. Среди методов твердофазной функционализации, только сочетание по Соногашире было адаптировано для автоматического синтезатора ДНК [254]. Большинство из упомянутых подходов были основаны на методах вне синтезатора (включая несовместимое с синтезатором микроволновое облучение или нагревание) или требовали длительного времени реакции (до 24 ч). Более того, в большинстве случаев конечный продукт представляет собой смесь региоизомеров, что усложняет рутинную очистку высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) из-за уширения или удвоения пиков. В настоящее время многие рутинные процедуры заменяются автоматизированными. Автоматизированные платформы могут использоваться не только для синтеза биополимеров, но также для малых молекул и определенных полимеров с помощью различных химических веществ. Целью работы по получению олигонуклеотидов, соержащих кластеры N-ацетилгалактозамина, была разработка подходов к CuAAC в твердой фазе в синтезаторе, которая обеспечивает получение одного региоизомера и может дополнить фосфорамидитный метод своей простотой, широтой применимости и низкой стоимостью мечения и конъюгации.

При проведении скрининга, конъюгация в растворе является трудоемкой процедурой, поэтому предпочтительны твердофазные подходы. Кроме того, высокая стабильность растворов азида при комнатной температуре по сравнению с фосфорамидитами должна снизить стоимость редко используемых модификаторов из-за длительного времени нахождения на синтезаторе. Единственным недостатком твердофазной конъюгации является требование стабильности конъюгата во время постсинтетического снятия защиты аммонолизом или аминолизом (в присутствии метиламина). Чтобы гарантировать, что этап твердофазной конъюгации не замедлит обычный синтез олигонуклеотидов, оптимальное время реакции для CuAAC должно быть менее 3 ч. В этом случае синтез олигонуклеотидов может проходить в течение ночи, включая стадию мечения и снятие защитных групп на синтезаторе во время

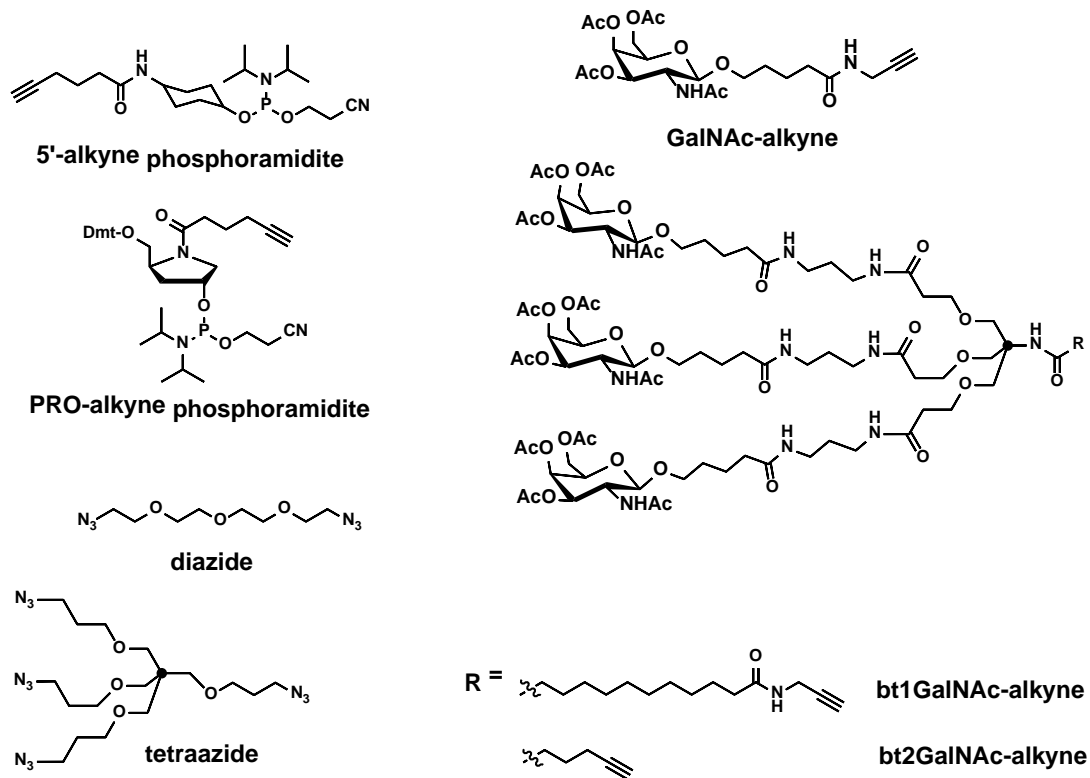
постсинтетических процедур. Кроме того, растворы должны быть стабильными, а концентрация производных азидов не должна превышать 0.05 М, чтобы сделать метод экономически конкурентоспособным с твердофазным синтезом фосфорамидита.

Первоначально протестированные водный *t*-BuOH и водный DMSO в качестве сред для твердофазной клик-реакции CuAAC показали высокую вязкость и поверхностное натяжение, что привело к образованию капель и неправильной подаче реагента в синтезаторе ДНК. Поэтому мы изучили твердофазную клик-реакцию CuAAC в нескольких апротонных полярных растворителях: формамиде, MeCN, диметилсульфоксиде, диметилформамиде и диметиламинамином (DMAA). Поскольку большинство компонентов реакции, включая азиды красителей, плохо растворялись в формамиде и MeCN, эти растворители были исключены из исследования. Затем мы провели скрининг ряда медных катализаторов (включая CuCl, Cu(MeCN)<sub>4</sub>PF<sub>6</sub>, CuI/N,N-диизопропилэтиламин (DIPEA), CuCl·трис-[(1-бензил-1*H*-1,2,3-триазол-4-ил)метил]амин (TBTA), CuBr·Me<sub>2</sub>S, CuBr·PhSMe, CuBr·TBTA и CuI·P(OEt)<sub>3</sub>, чтобы найти оптимальный вариант. В случае CuCl, Cu(MeCN)<sub>4</sub>PF<sub>6</sub>, CuI/DIPEA и CuCl·TBTA выходы продукта были менее 5–30%, тогда как для CuBr·PhSMe, CuBr·TBTA и CuI·P(OEt)<sub>3</sub> конверсия превысила 95%. Для оптимизации твердофазной клик-реакции мы начали с относительно высоких концентраций катализаторов (100 мМ) и постепенно снижали концентрации. Комплекс тиоанизола был исключен, поскольку выходы значительно снижались при низких концентрациях реагентов; наблюдалось образование некоторых побочных продуктов, а длительный неприятный запах делал работу неудобной. Было обнаружено, что DMSO является плохим выбором как для CuBr·TBTA, так и для CuI·P(OEt)<sub>3</sub>, поскольку некоторые осадки образовывались в растворах в течение ночи, вероятно, в результате окисления катализатора. Эти два катализатора дали подобные выходы, а CuBr·TBTA оказался немного лучше с точки зрения конверсии. Наилучший результат показала каталитическая смесь CuI·P(OEt)<sub>3</sub>/DMAA, поскольку она всегда давала качественные конъюгаты без особых мер предосторожности.

Направленная доставка является ключевым моментом для олигонуклеотидной терапии. Липидные наночастицы и конъюгаты N-ацетилгалактозамина (GalNAc) доказали свою эффективность для антисмысловой олигонуклеотид- и siRNA-направленной доставки в печень в различных клинических испытаниях. Главной особенностью сильно модифицированных конъюгатов siRNA-GalNAc является чрезвычайно длительное действие *in vivo* после подкожной инъекции (до 9 месяцев) при низкой ED<sub>50</sub> 0.5–2 мг/кг [201]. Такой замечательный эффект является результатом их повышенной стабильности и эффективного рецептор-опосредованного эндоцитоза рецептором ASGPR в гепатоцитах.



Конъюгаты, содержащие кластеры GalNAc с определенной геометрией, имеют значительно большее сродство к ASGPR из-за олигомеризации рецептора в клеточной мембране. Конечная цель нашего исследования состояла в более простой разработке новых конъюгатов GalNAc-siRNA. После проникновения в цитозоль, антисмысловая цепь siRNA захватывается белковым аппаратом РНК-интерференции, в то время как смысловая цепь отщепляется и деградирует. Таким образом, доставочный фрагмент должен быть присоединен к смысловой цепи, чтобы минимизировать влияние на взаимодействия белок-РНК. Олигонуклеотид ANSA является смысловой цепью широко используемой siRNA для нацеливания на белок теплового шока гомолога АТФазы 1 (ANA1 или ANSA1) у мышей [255]. Этот белок равномерно экспрессируется в большинстве тканей и часто используется для изучения специфичности направленной доставки siRNA *in vivo*. Luc является смысловой цепью siRNA люциферазы, которая используется в качестве отрицательного контроля для исследований *in vitro* и *in vivo*, поскольку люцифераза отсутствует у мышей дикого типа.



**Рис. 52.** Модификации, использованные для синтеза олигонуклеотидных конъюгатов с кластерами N-ацетилгалактозамина.

Процедура конъюгации основана на двух последовательных клик-реакциях CuAAC с моноалкиновым олигонуклеотидом: сначала с ди- или тетраазидом, затем с алкиновыми производными GalNAc (Рис. 52). Производные диазида и тетразида используются в большом избытке (10 или 20 экв. на алкин), чтобы исключить межолigonуклеотидное

сшивание, в то время как более дорогостоящие алкиновые производные GalNAc добавляются в минимальном избытке. Синтезирован ряд мульти-GalNAc-олигонуклеотидных конъюгатов с различной топологией (Рис. 53).

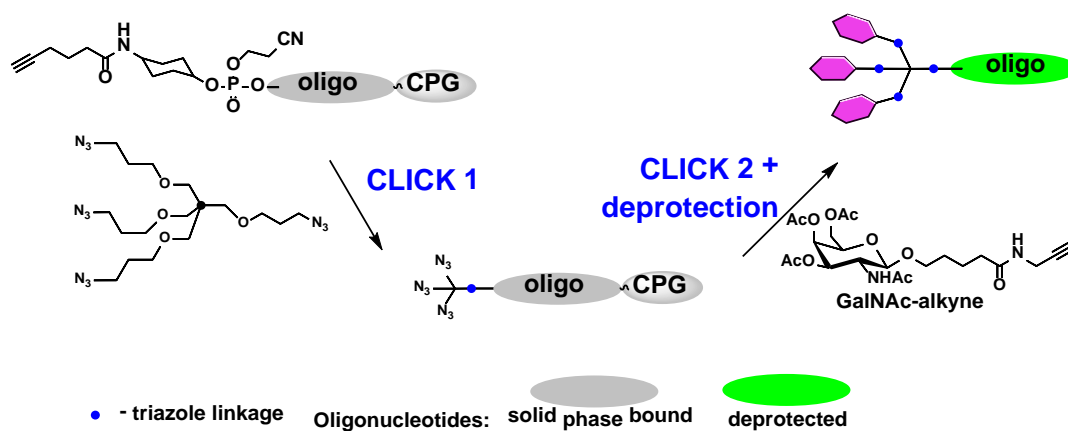


Рис. 53. Схема твердофазного синтеза конъюгатов олигонуклеотидов с GalNAc-кластерами.

Твердофазный подход CuAAC на основе тетразида (Рис.53) позволил нам синтезировать даже олигонуклеотидный конъюгат с шестью производными Tris-GalNAc, присоединенными как к 5'-, так и к 3'-концам (по три на каждом конце). Это позволяет ввести 18 остатков GalNAc на олигонуклеотид после одного добавления (Рис. 54).

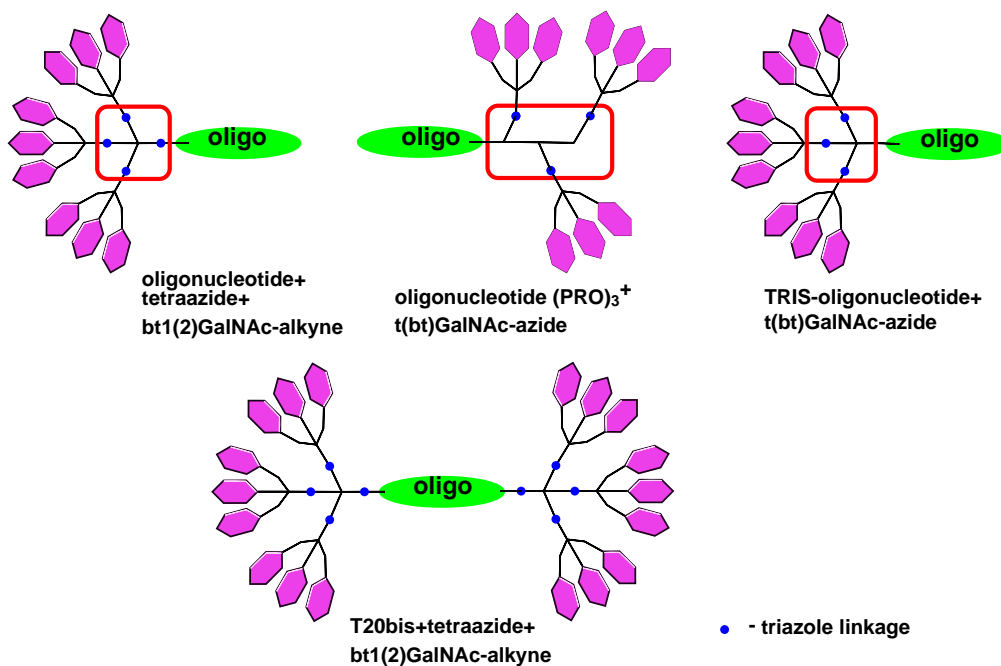
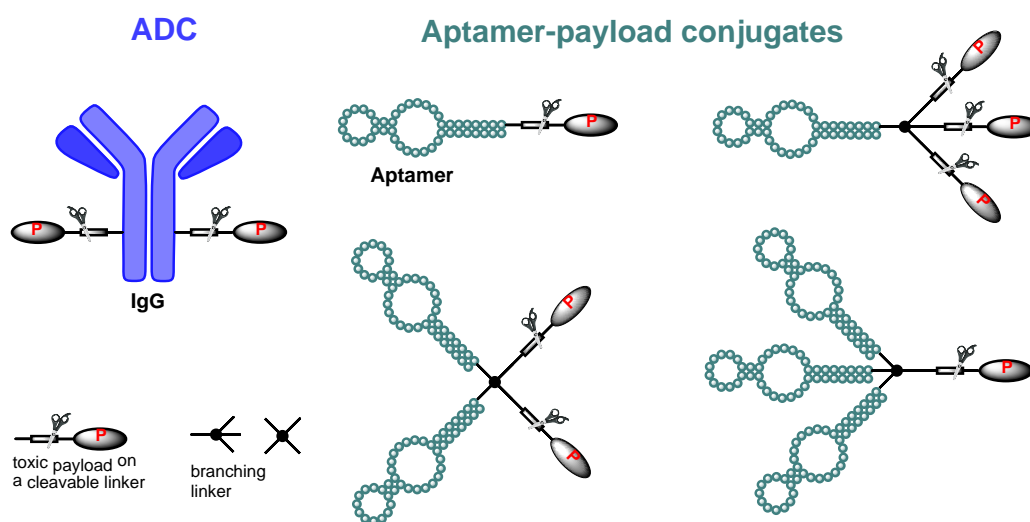


Рис. 54. Структуры конъюгатов с GalNAc-кластерами.

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

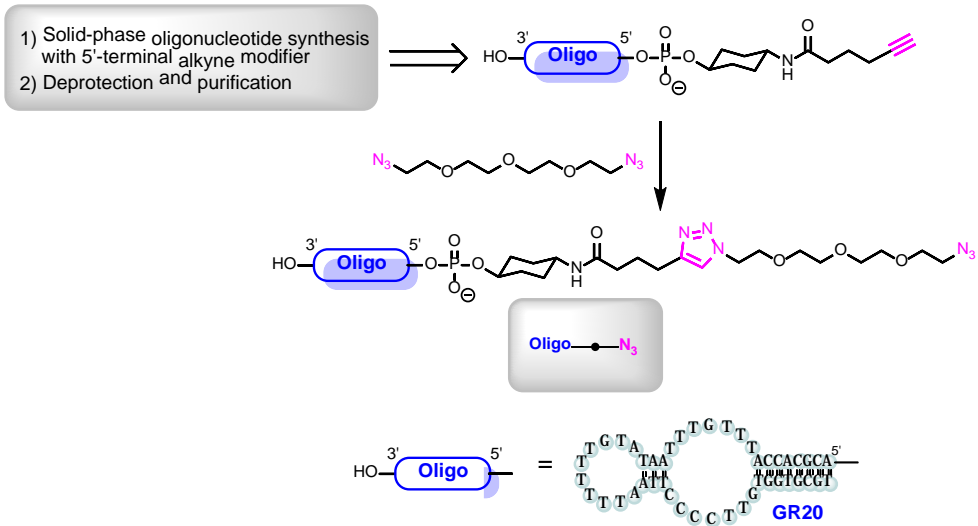
Конъюгаты антитело–препарат (ADC) являются прекрасными примерами адресной доставки препарата («полезной нагрузки») к опухолям; их эффективность, фармакодинамика и фармакокинетика достаточно хорошо изучены [256]. Концепция адресной доставки лекарств основана на высокоспецифичном для опухоли взаимодействии между целевой молекулой и опухолевым маркером, которое заключается в связывании с этим маркером (рецептором) с последующей интернализацией в клетку. Внутриклеточное высвобождение полезной нагрузки начинает убивать опухолевую клетку в соответствии с механизмом действия препарата [257]. Последние два десятилетия были знаковыми в разработке адресной терапии рака, связанной с высокими финансовыми затратами, однако наборы используемых полезных нагрузок [258] и расщепляемых линкеров довольно ограничены. Более того, сложность сайт-специфической модификации антител накладывает проблему однородности ADC и стехиометрического контроля соотношения лекарство-антитело [259]. Существует несколько примеров ADC, разрабатываемых для терапии опухолей мозга [260], однако уникальная биология опухолей мозга требует специально разработанных стратегий разработки лекарств [261]. Хотя предполагается, что ГЭБ проницаем во многих случаях глиобластомы, прохождение ADC через него все еще является проблемой, которая требует изучения и разработки подходов для преодоления плохого распределения конъюгатов лекарственных средств в опухоль через ГЭБ. Аптамеры представляют собой олигонуклеотидные последовательности, способные распознавать специфическую цель со средством, сопоставимым со связыванием антитела с антигеном. Их терапевтический потенциал хорошо известен [262], включая противораковые применения [263–266]. Было разработано несколько последовательностей аптамеров для нацеливания на EGFR [267–271]. Вдохновленные активной разработкой селективных противораковых препаратов на основе антител, мы стремимся нацеливаться на EGFR с помощью аптамеров, загруженных противораковым препаратом MMAE. Потенциальные преимущества конъюгатов аптамер-лекарство заключаются в следующем: 1) высокое сродство к специфической цели; 2) возможности сайт-специфической модификации аптамеров (современный олигонуклеотидный синтез позволяет контролировать все модификации и однородность). Однако есть некоторые недостатки, связанные с низкой стабильностью в кровотоке, поскольку нуклеиновые кислоты не приспособлены для функционирования в таких условиях. Тем не менее, проблема стабильности в кровотоке была преодолена в бессмысловых олигонуклеотидах с использованием углеводных и фосфатных

модификаций [272]. В этой парадигме аптамер является средством доставки, но интернализация не очевидна, поэтому нам необходимы конъюгаты различной структуры для изучения их проникновения в клетки посредством опосредованной EGFR интернализации. Таким образом, задача состояла в разработке методологии конъюгации аптамера с полезным грузом через расщепляемый катепсином В линкер и синтеза более высокомолекулярных, разветвленных конъюгатов. Последние могут содержать один, два и три аптамерных фрагмента (Рис. 55). В целом, мультимеризация была признана полезным подходом к улучшению специфичности и средства аптамеров [242–244]. Пептидные линкеры, расщепляемые катепсином В, уже были объединены с олигонуклеотидами, однако с использованием довольно сложных подходов [273–275]. В этой работе предложены подходы к синтезу разветвленных аптамерных конъюгатов с ферментативно-отщепляемой нагрузкой в виде монометилауристатина Е (ММАЕ).



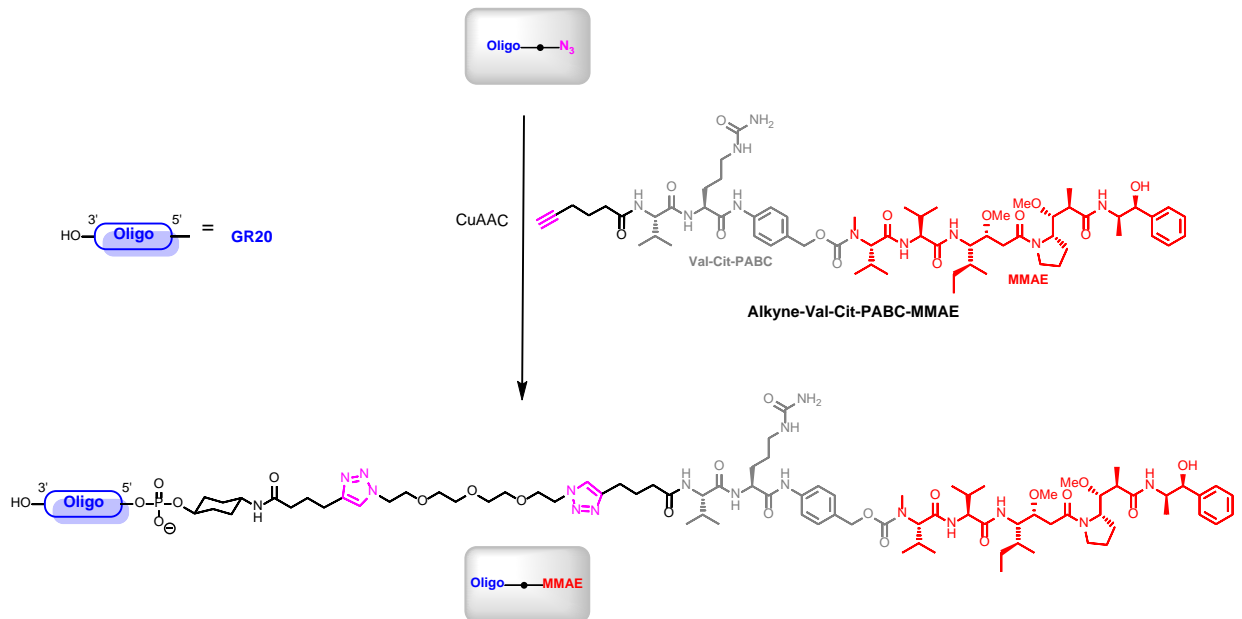
**Рис. 55.** Схематические структуры распространенных конъюгатов антитело–лекарственное средство (соотношение лекарственное средство/антитело может варьироваться от 1 до 8) и конъюгатов аптамер–лекарственное средство, полученных в этой работе.

В качестве модели EGFR-таргетинга был выбран ДНК-аптамер – GR20 [271], а высокоцитотоксичный монометилауристатин (ММАЕ) представлял собой полезную нагрузку в конъюгатах аптамеров. ММАЕ и его конъюгаты не одобрены для лечения опухолей мозга. Для соединения части полезной нагрузки с аптамером в качестве линкера был выбран катепсин В, поскольку он одобрен в нескольких ADC и расщепляется под воздействием фермента в лизосомах [276]. Ключевой реакцией конъюгации было Cu(I)-катализируемое азид-алкиновое циклоприсоединение (CuAAC) как быстрая, удобная реакция, биоортогональная по отношению к аптамерам, ММАЕ и линкеру Val-Cit-PAVC. Синтетические аптамеры были получены с использованием стандартного протокола путем модификации 5'-алкином, после чего была проведена CuAAC с избытком диазида или тетраазида в жидкой фазе, что дало азид-модифицированные олигонуклеотиды (Схема 4).



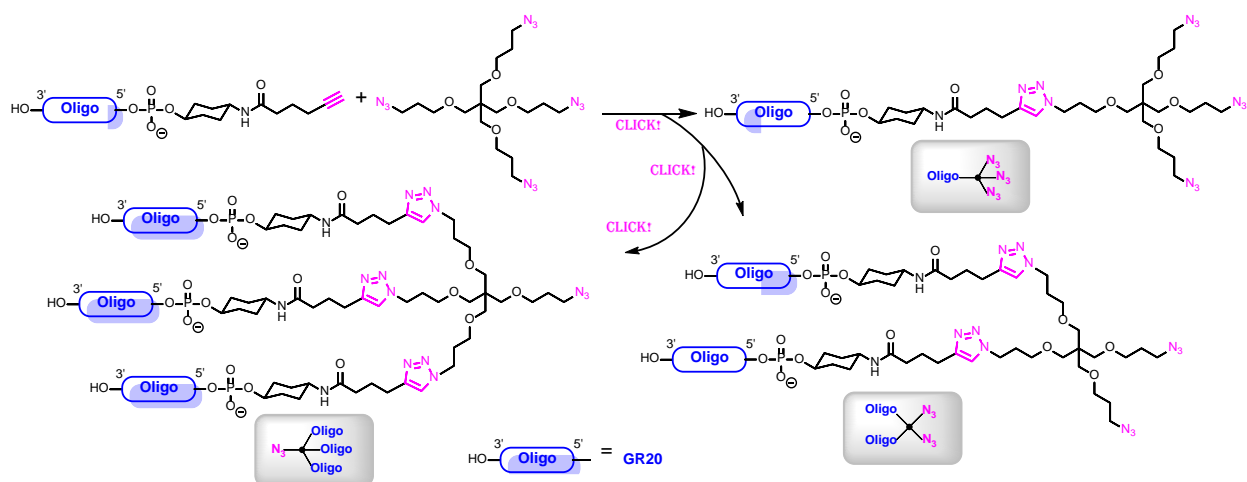
**Схема 4.** Синтез 5'-азидо-модифицированных олигонуклеотидов.

Олигонуклеотид, модифицированный 5'-азидом, далее был связан с алкиновым производным полезной нагрузки, уже содержащим ферментативно расщепляемый линкер, Al-kyne-Val-Cit-PABC-MMAE (Схема 5). CuAAC клик-реакция была проведена в водном растворе и дала высокие выходы конъюгатов олиго-полезная нагрузка со стехиометрией 1:1 (Схема 2).



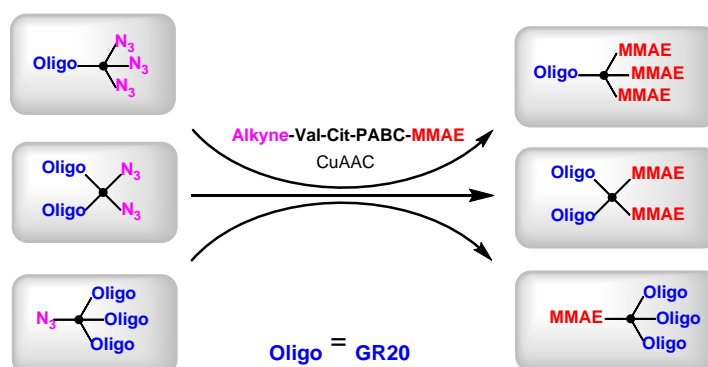
**Схема 5.** Синтез конъюгатов олигонуклеотид-5'-полезная нагрузка 1:1; красный – полезная нагрузка MMAE, серый – расщепляемый катепсином линкер.

Клик-реакция алкиновых олигонуклеотидов с тетразидом **85** приводит к образованию набора продуктов, состоящего из разветвленных конъюгатов – Oligo(N<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, (Oligo)<sub>2</sub>(N<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, (Oligo)<sub>3</sub>N<sub>3</sub>. Стехиометрия полученных продуктов была настроена избытком азиды по отношению к алкиновому олигонуклеотиду (Схема 6).



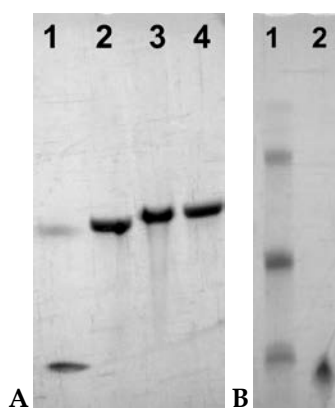
**Схема 6.** CuAAC-модификация 5'-алкин-олигонуклеотидов тетразидом **85**.

Полученные азидо-модифицированные олигонуклеотиды были трансформированы в конъюгаты с полезной нагрузкой через CuAAC с алкин-модифицированным Val-Cit-PABC-(MMAE). Стехиометрия конъюгатов варьировалась в диапазоне 1:3, 2:2, 3:1 (Схема 7). Целевые конъюгаты были очищены с помощью препаративной ВЭЖХ и проанализированы с помощью денатурирующего ПААГ и ВЭЖХ.



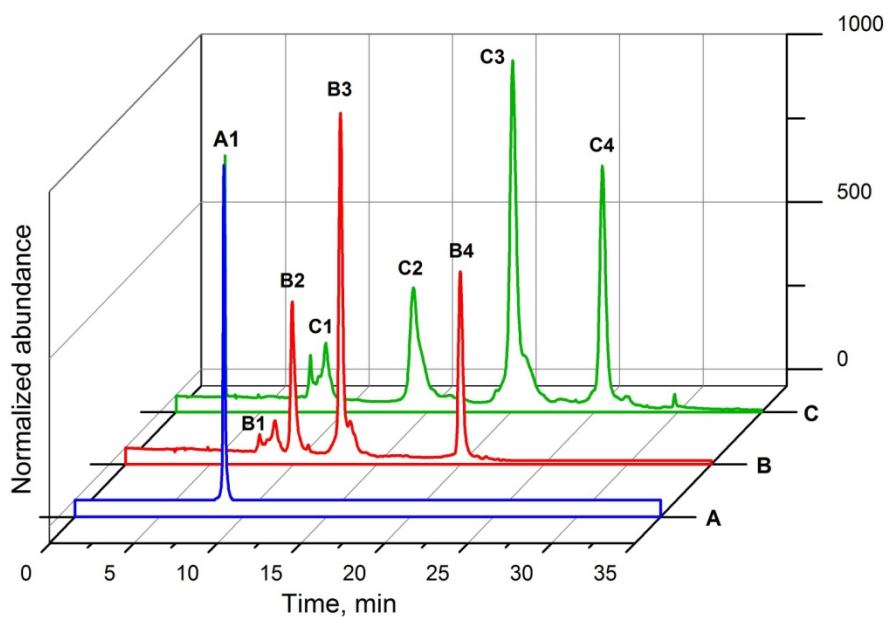
**Схема 7.** CuAAC-модификация 5'-алкин-олигонуклеотидов тетразидом. Структуры полезной нагрузки и расщепляемого линкера см. на схеме 2.

Была создана панель из четырех загруженных MMAE конъюгатов аптамера GR20 с четырьмя различными стехиометриями. Клик-реакция с модифицированным алкином MMAE была проведена *one-pot* с контролем с помощью ВЭЖХ и электрофореза в ПААГ промежуточных модифицированных азидом конъюгатов аптамера GR20 (Схемы 5, 6). Первоначальный алкин-GR20 (Рис. 56В) имел самую высокую электрофоретическую подвижность. Электрофоретический контроль клик-реакции между алкином-GR20 и избытком диазида или тетразида показал образование продуктов, OligoN<sub>3</sub> и Oligo(N<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, соответственно (Рис. 56А).



**Рис. 56.** 10% аналитический денатурирующий ПААГ. (А) 1 – красители BB+XC, 2 – алкин-GR20, 3 – щелчок алкина-GR20 с диазидом ТЭГ, 4 – щелчок алкина-GR20 с избытком тетразида. (В) 1 – щелчок алкина-GR20 с тетразидом в молярном соотношении 3:1, 2 – алкин-модифицированный GR20.

Непрореагировавшего алкина-GR20 не наблюдалось с помощью электрофореза. Пик В1 (Рис. 57) был определен как пик тетра-конъюгата, поэтому в последующей реакции с алкином-ММАЕ он не трансформировался в нагруженный конъюгат, и мы наблюдали его в неизменном виде как пик С1 (Рис. 57). Все азидосодержащие конъюгаты аптамера GR20 с соответствующими пиками В2, В3 и В4 трансформировались в нагруженные конъюгаты С2, С3 и С4 соответственно (Рис. 57).



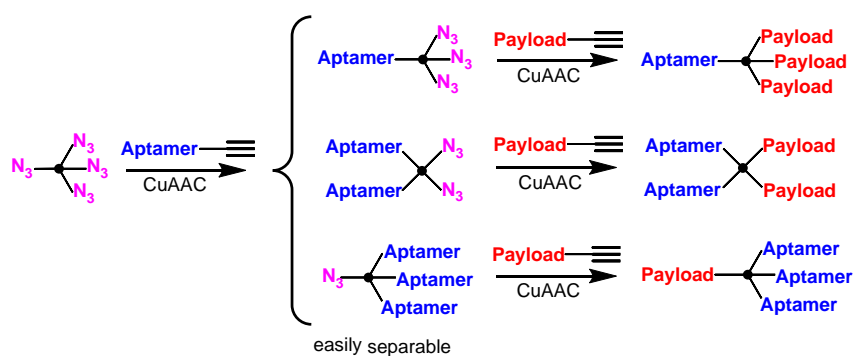
**Рис. 57.** Типичный профиль ВЭЖХ клик-реакции между алкином-GR20 и тетразидом. А – Профиль ВЭЖХ чистого исходного алкиномодифицированного аптамера GR20. В – Профиль ВЭЖХ клик-реакции между тетразидом и алкином-модифицированным GR20. С – Профиль ВЭЖХ клик-реакции между смесью азид-модифицированного GR20 и алкином-модифицированного MMAE.

Биологические свойства нескольких конъюгатов были изучены с помощью анализа МТТ на раковых клетках EGFR+: модели глиобластомы U251, U87 и рак толстой кишки НСТ116. Для тестов на жизнеспособность клеток мы выбрали пару конъюгатов,

GR20MMAE и GR20MMAE<sub>3</sub>, чтобы сравнить влияние стехиометрии конъюгата. Пара конъюгатов содержала один и три фрагмента MMAE. Линия клеток HCT116 показала хороший ответ на оба конъюгата. Значения IC<sub>50</sub> GR20MMAE и GR20MMAE<sub>3</sub> для HCT116 имели приблизительно наномолярную величину. Линия клеток U87 была довольно стабильной в присутствии даже высоких концентраций конъюгатов GR20MMAE и GR20MMAE<sub>3</sub>, поэтому анализ МТТ не показал значения концентрации, при которой может наблюдаться 50% жизнеспособность клеток. Однако другая модельная клеточная линия глиобластомы, U251, показала различия между конъюгатами GR20MMAE и GR20MMAE<sub>3</sub>. Конъюгат с тремя фрагментами MMAE, GR20MMAE<sub>3</sub>, показал более мощную активность по сравнению с GR20MMAE, который был практически неэффективен против клеточной линии U251.

Медь(I)-катализируемая клик-реакция – надежный способ синтеза олигонуклеотидных конъюгатов. Алкиновые производные олигонуклеотидов легкодоступны. Полезная нагрузка MMAE – это короткий, химически стабильный пептид с хорошо разработанными процедурами для его модификации различными функциональными ферментативно расщепляемыми линкерами. MMAE – это мощный ингибитор тубулина, успешно используемый в качестве полезной нагрузки в нескольких одобренных ADC на Val-Cit-PAVC-линкере [277]. 46-мерная ДНК-последовательность – EGFR-таргетирующий аптамер GR20, использовалась в качестве модельного олигонуклеотида для построения конъюгатов. ДНК-аптамеры обычно структурированы, образуя одну или несколько шпилек в нормальных условиях. Конъюгаты содержат олигонуклеотид, точку разветвления и модули линкера/полезной нагрузки. Эти фрагменты соединяются вместе в двух последовательных клик-реакциях (Схема 8). Первый шаг – реакция тетразида **85** с модифицированным алкином аптамером. Она дает три продукта со стехиометрией аптамер/азид 1:3, 2:2 и 3:1. Соотношение продуктов реакции контролируется соотношением исходных соединений. Эти промежуточные азидные продукты, содержащие один, два или три олигонуклеотидных фрагмента, легко разделяются с помощью электрофореза в ПААГ или ВЭЖХ и, следовательно, легко доступны в виде чистых индивидуальных соединений. Последние легко преобразуются в соответствующие конъюгаты аптамер–полезная нагрузка (Схема 8).





**Схема 8.** Двухэтапная сборка CuAAC различных конъюгатов аптамер–полезная нагрузка.

Полезная нагрузка участвует в этапе модификации как производное линкера. Почти все распространенные ферментативно расщепляемые линкеры и токсичные полезные нагрузки выдерживают условия CuAAC, что делает подход универсальным и подходящим для всего имеющегося диапазона линкеров и полезных нагрузок, включая потенциально новые [278]. Более того, модульный принцип может быть разработан в будущем для построения конъюгатов, несущих две разные полезные нагрузки или пептиды, улучшая транспорт через ГЭБ. Сочетание в одном конъюгате двух полезных нагрузок с разными мишенями рассматривается как перспективный подход к преодолению резистентности опухолей к терапии. Разработка пептидов/белков, нацеленных на рецептор трансферрина, является актуальной темой для доставки лекарств в мозг [279–281]. Поэтому мы продолжим разработку химических подходов к конъюгатам, содержащим распознающие, усиливающие транспорт и терапевтические фрагменты.

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

## Глава 3

### Экспериментальная часть

(материалы и методы)

#### 3.1. Общие методы

DMSO использовали свежеперегнанным над CaH<sub>2</sub> при пониженном давлении. Дихлорметан, хлороформ и ацетонитрил перегоняли над CaH<sub>2</sub> непосредственно перед использованием. Все остальные растворители (гексан, этилацетат, этанол, ацетон) очищали перегонкой. Тетрагидрофуран абсолютизировали перегонкой над натрий-бензофенонкетилем в инертной атмосфере аргона. Пентаэритрит (98%, Sigma-Aldrich), метансульфонилхлорид (99%, Fluka) и тетрабутиламмоний гидроксид (40% водн., Fluka) использовали без дополнительной очистки. Спектры ЯМР 500 МГц <sup>1</sup>H и 125.7 МГц <sup>13</sup>C были записаны на спектрометрах Bruker DRX-500 или Bruker Avance 500 и отнесены к DMSO-*d*<sub>6</sub> (2.50 м.д. для остаточных <sup>1</sup>H и 39.5 м.д. для <sup>13</sup>C) или CDCl<sub>3</sub> (7.26 м.д. для остаточных <sup>1</sup>H и 77.16 м.д. для <sup>13</sup>C). Константы спин-спинового взаимодействия <sup>1</sup>H ЯМР приведены в герцах (Гц) и относятся к соответствующим мультиплетностям. Аналитическую тонкослойную хроматографию проводили на алюминиевых пластинах Kieselgel 60 F<sub>254</sub> с предварительно нанесенным флуоресцентным покрытием (Merck); пятна на ТСХ визуализировали освещением УФ-лампой (с длиной волны 254 нм), с помощью проявки дихроматом калия в серной кислоте, проявкой перманганатом калия, йодом или молибдатом церия. Для препаративной очистки колоночной хроматографией использовали силикагель Merck Kieselgel 60 (размер частиц 0.040–0.063 мм).

ИК спектры записаны на приборе ИК-Фурье спектрометре Bruker ALPHA. Образцы измеряли либо как KBr в виде таблеток или тонких пленок между пластинами KBr. Масс-спектры высокого разрешения с ионизацией электрораспылением (ESI HRMS) низкомолекулярных соединений регистрировались с помощью Thermo Scientific Orbitrap Exactive масс-спектрометра в режиме положительных ионов.

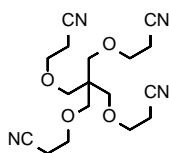
Высокоэффективную хроматографию олигонуклеотидных конъюгатов проводили на хроматографе Agilent 1100 с использованием колонки Sunfire C18 (4.6×250 мм), линейный градиент от 0 до 40% ацетонитрила в градиенте ацетата аммония от 50 до 30 mM в течение 24 мин, линейный градиент ацетонитрила от 40 до 80% в градиенте ацетата аммония от 30 mM до 10 mM в течение 3 мин, линейный градиент от 10 mM до 0 mM ацетата аммония в 80% ацетонитриле, линейный градиент от 80 до 100% ацетонитрила.

Олигонуклеотиды синтезировали на ДНК-синтезаторе ABI 3400 фосфорамидитным методом в соответствии с рекомендациями производителя. Защищенные 2'-дезоксирибонуклеозид-3'-фосфамидиты, твердофазный носитель Unylinker-CPG (500Å) и

S-этилтио-1*H*-тетразол были производства ChemGenes; 5'-алкинфосфорамидит, алкиновые производные красителей Cy3 и Cy5 были производства Lumiprobe LLC. Отщепление от твердофазного носителя и деблокирование олигонуклеотидов проводили с помощью смеси АМА – 1:1 (25% аммиак – 40% метиламин, об./об.) в течение 2 ч при комнатной температуре. Масс-спектры олигонуклеотидных конъюгатов регистрировали с использованием системы Q-TOF Bruker Maxis Impact.

### 3.2. Синтез низкомолекулярных соединений

#### 5,5-Бис(4-циано-2-оксабутил)-1,9-дициано-3,7-диоксанонан (79)



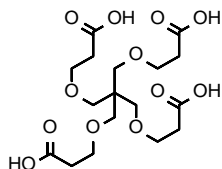
Пентаэритрит (20.0 г, 147 ммоль) суспендировали в воде (150 мл) при интенсивном перемешивании. Через 15 минут добавляли акрилонитрил (58.5 мл, 46.75 г, 882 ммоль) 40% раствор гидроксида тетрабутиламмония (4.4 мл). Полученная гетерогенная реакционная смесь интенсивно перемешивалась 24 ч. Образовавшаяся двухфазная жидкая смесь отстаивалась и нижний слой, содержащий сырой маслообразный продукт отделяли с помощью делительной воронки. Оставшийся продукт экстрагировали из верхнего (водного) слоя этилацетатом (3×150 мл). Органические экстракты объединили вместе с нижним отобранном ранее слоем, промывали водой (3×300 мл), насыщенным раствором NaCl (100 мл), сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и отгоняли растворитель в вакууме на роторном испарителе. Полученное масло переупаривали с дихлорметаном (100 мл), добавляли эквивалентное количество 96% этанола и охлаждали до -20°C. Выпавший кристаллический осадок отфильтровывали. Маточный раствор упаривали и повторяли кристаллизацию из этанола оставшегося масла. Две порции кристаллического продукта объединяли и упаривали остатки растворителя из продукта в эксикаторе в вакууме масляного насоса. Получено бесцветное кристаллическое вещество (33.41 г; 96 ммоль; выход 65%), т. пл. 44–45°C (EtOH).

<sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 2.74 (т, 8H, *J* = 5.9 Гц), 3.39 (с, 8H), 3.58 (т; 8H; *J* = 5.9 Гц).

<sup>13</sup>C ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 17.97, 45.21, 65.63, 68.42, 119.26.

ИК (KBr)  $\nu_{\max}$  = 3501, 2975, 2914, 2876, 2251, 1495, 1370, 1267, 1173, 1108, 853 cm<sup>-1</sup>.

*6,6-Бис(4-карбокси-2-оксабутил)-4,8-диоксаундекан-1,11-дикарбоновая кислота (80)*

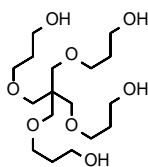


В 500-мл колбу, снабженную магнитной мешалкой и обратным холодильником, загрузили 5,5-бис(4-циано-2-оксабутил)-1,9-дициано-3,7-диоксанонан (50 г, 143.5 ммоль) и 36% соляную кислоту (130 мл). Полученную смесь нагрели до 80°C на масляной бане при перемешивании. Через 30 мин начали выпадать кристаллы хлорида аммония, а через 3 ч охладили реакционную смесь в проточной воде и затем в морозильной камере (до -20°C). Осадок NH<sub>4</sub>Cl отфильтровали. Фильтрат упарили в вакууме до образования смеси маслообразного и твердого (остатки хлорида аммония) веществ. К остатку добавили порцию ацетона (200 мл) для растворения сырой тетракарбоновой кислоты. Осадок NH<sub>4</sub>Cl отфильтровали. После упаривания растворителя в вакууме маслообразный остаток закристаллизовали растворением в ацетонитриле (70 мл) и длительным выдерживанием при -20°C. После фильтрования выпавшего в осадок продукта, маточный раствор упарили и повторно перекристаллизовали из ацетонитрила. Две полученные порции кристаллического вещества объединили и удалили остатки растворителя в вакууме масляного насоса. Кислота получена в виде бесцветных кристаллов (58 г; 137 ммоль; выход 95%). Температура плавления 92–95 °С, т. пл. 99–101°C (MeCN).

<sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 2.4 (т, 8H, *J* = 6.3 Гц), 3.24 (с, 8H), 3.53 (с; 8H; *J* = 6.3 Гц), 12.08 (уш. с, 4H).

<sup>13</sup>C-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 34.68, 45.10, 66.75, 69.03, 172.63.

*6,6-Бис(5-гидрокси-2-оксапентил)-4,8-диоксаундекан-1,11-диол (81)*



Сухую 1-литровую трехгорлую колбу, снабженную механической мешалкой, обратным холодильником (выход которого сообщается с камерой с аргоном) и септой продували аргоном, затем вносили абсолютный THF (200 мл) и с помощью шприца с иглой добавляли комплекс борана с диметилсульфидом через септу (61.5 мл; 648.6 ммоль). Полученный раствор нагревали на масляной бане до 50°C при перемешивании. Септу заменяли на 500-мл капельную воронку с компенсатором давления, которая содержала раствор тетракислоты **80** (55 г; 129.7 ммоль) в абсолютном THF (400 мл). Раствор кислоты медленно прикапывали к интенсивно перемешиваемому раствору

комплекса борана с диметилсульфидом. После того как вся кислота была добавлена, реакционная смесь перемешивалась в течение часа. После охлаждения до комнатной температуры, осторожно добавляли при интенсивном перемешивании водный раствор NaOH (25%; 150 мл). Образовавшуюся двухфазную смесь переносили в 1-литровую делительную воронку. Органический верхний слой отделяли, а оставшийся сырой продукт экстрагировали из водного слоя тетрагидрофураном (2×100 мл). Органические фракции объединяли и осушали над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Растворитель отгоняли в вакууме. Полученный сырой маслообразный продукт хроматографировали на силикагеле в системе CHCl<sub>3</sub>–EtOH (градиент этанола от 10% до 20%). Состав фракций контролировали с помощью ТСХ (20% EtOH в CHCl<sub>3</sub>), планшеты визуализировали с помощью хромпика (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> в концентрированной серной кислоте). Фракции, содержащие продукт, объединяли и упаривали. Получен спирт **81** в виде бесцветной очень вязкой жидкости (32.02 г; 86.9 ммоль; выход 67%).

<sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 1.61 (к, 8H, *J* = 6.4 Гц), 3.25 (с, 8H), 3.35–3.40 (м; 8H), 3.40–3.46 (м, 8H), 4.37 (т, 4H, *J* = 5.1 Гц).

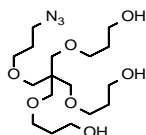
<sup>13</sup>C ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 32.63, 45.0, 57.95, 67.93, 69.19.

ИК (чистый)  $\nu_{\max}$  = 3356, 2944, 2871, 1672, 1485, 1422, 1372, 1300, 1110, 644 cm<sup>-1</sup>.

Масс-спектр высокого разрешения (электрораспыление): *m/z* 369.2477 [M+H]<sup>+</sup>, 391.2295 [M+Na]<sup>+</sup> (теор. для C<sub>17</sub>H<sub>37</sub>O<sub>8</sub><sup>+</sup>, 369.2483; C<sub>17</sub>H<sub>36</sub>O<sub>8</sub>Na<sup>+</sup>, 391.2302).

### Методика 1

#### 6,6-Бис(5-гидрокси-2-оксапентил)-4,8-диокса-11-гидроксиундец-1-ил азид (**82**)



Мезилхлорид (7.06 г, 60 ммоль) добавляли по каплям к смеси тетракис (5-гидрокси-2-оксапентил) метана **81** (17.26 г, 50 ммоль) и триэтиламина (11.1 мл, 80 ммоль) в сухом дихлорметане (300 мл). Реакцию контролировали с помощью ТСХ (10% EtOH в CHCl<sub>3</sub>, исходный спирт *R<sub>f</sub>* = 0.33). После расходования всего исходного вещества реакционную смесь промывали дистиллированной водой (2×100 мл), рассолом (3×50 мл) и сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. После упаривания растворителя получили желтоватую маслянистую жидкость, которую растворяли в сухом DMSO (60 мл) и добавляли азид натрия (10 г; 154 ммоль) при магнитном перемешивании. Через 12 ч добавляли воду (120 мл) и смесь продуктов экстрагировали из водного слоя этилацетатом (4×100 мл), органические фракции объединяли, промывали дистиллированной водой (5×100 мл), рассолом (3×100 мл) и сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. После упаривания растворителя в вакууме остаток

хроматографировали на силикагеле (градиент 96% этанола от 20 до 45% в  $\text{CHCl}_3$ ). Был получен бесцветный жидкий продукт (5.24 г, 16 ммоль, выход 32%).  $R_f = 0.34$  (5% EtOH в  $\text{CHCl}_3$ ).

$^1\text{H}$ -ЯМР (500 МГц;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.71 (т, 6H,  $J = 5.5$  Гц), 3.55 (т, 6H,  $J = 5.56$  Гц), 3.47 (ушир. с, 3H), 3.44 (т, 2H,  $J = 5.97$ ). Гц), 3.38 (с, 6H), 3.36–3.32 (м, 4H), 1.84–1.74 (м, 8H).

$^{13}\text{C}$ -ЯМР (125 МГц;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  70.95, 70.47, 70.42, 68.12, 61.5, 48.54, 44.85, 31.8, 28.99.

ESI HRMS  $m/z$ : рассчитано для  $\text{C}_{17}\text{H}_{36}\text{N}_3\text{O}_7$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): 394.2548, найдено: 394.2557.

Также в процессе колоночной хроматографии были получены диазид **83** (4.7 г; 14 моль; выход 27%) и триазид **84** (1.43 г; 4 ммоль; выход 8%) в виде бесцветных вязких жидкостей.

### *Методика 2*

#### *6,6-Бис(5-азидо-2-оксапентил)-4,8-диокса-11-азидоундекан-1-ол (84)*

Мезилхлорид (3.73 г, 32.7 ммоль) добавляли по каплям к смеси 6,6-бис(5-гидрокси-2-оксапентил)-4,8-диоксаундекан-1,11-диола **81** (4.00 г, 10.9 ммоль) и триэтиламина (5.31 мл, 38.2 ммоль,  $d$  0.726 г/мл) в сухом DCM (50 мл). Реакцию контролировали по ТСХ (10% EtOH в  $\text{CHCl}_3$ , исходный спирт  $R_f = 0.33$ ). Реакционную смесь промывали дистиллированной водой (2×50 мл) и сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Упаривание растворителя в вакууме дало желтоватую маслянистую жидкость. Смесь мезилатов растворяли в сухом DMSO (30 мл) и обрабатывали азидом натрия (7.00 г; 108 ммоль) добавляли при перемешивании на магнитной мешалке. Через два дня ТСХ (50% EtOAc в гексане; триазид  $R_f$  0.5) показало, что реакция протекает полный. Добавляли воду (30 мл) и смесь продуктов экстрагировали из воды EtOAc (3×100 мл); органические фракции объединили, промыли дистиллированной водой (5×100 мл) и высушили. над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . После испарения растворителя в вакууме остаток хроматографировали на силикагеле (EtOAc в гексане, градиент EtOAc от 20 до 45%). Искомое соединение **84** было получено в виде бесцветной жидкости выход 1.38 г (3.1 ммоль, 28.6%).

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.73–3.81 (м, 2H), 3.59 (т, 2H,  $J = 5.5$  Гц), 3.46 (т, 6H;  $J = 5.9$  Гц), 3.32–3.43 (м, 14H), 2.58 (уш.с, 1H), 1.77–1.89 (м, 8H);

$^{13}\text{C}$  ЯМР (500 МГц;  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  71.46, 71.00, 70.18, 68.09, 62.55, 48.61, 45.27, 31.93, 29.11.

ИК (чистый)  $\nu_{\text{max}}$  3449, 2929, 2871, 2097, 1718, 1459, 1300, 1263, 1111, 944  $\text{cm}^{-1}$ .

ESI HRMS  $m/z$  444.2673  $[M+H]^+$ , 466.2423  $[M+Na]^+$  (рассчитано для  $C_{17}H_{34}N_9O_5^+$ , 444.2677;  $C_{17}H_{33}N_9O_5Na^+$ , 466.2497).

Побочные продукты тетразид **85** (1.32 г; 2.8 ммоль; выход 25.8%) и диазид **83** (0.36 г; 0.9 ммоль; выход 8%) были также выделены в виде бесцветных жидкостей.

*6,6-Бис(5-азидо-2-оксапентил)-4,8-диоксаундекан-1,11-диол (83)*

$^1H$ -ЯМР ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 1.74–1.89 (м, 8H), 3.05 (с, 2H), 3.31–3.42 (м, 12H), 3.46 (т, 4H,  $J$  = 5.9 Гц), 3.58 (т, 4H,  $J$  = 5.5 Гц), 3.74 (т, 4H,  $J$  = 5.3 Гц).

$^{13}C$ -ЯМР ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 29.11, 31.89, 45.11, 48.64, 61.94, 68.17, 70.35, 70.87, 71.1.

ИК (чистый)  $\nu_{max}$  3419, 2929, 2871, 2097, 1372, 1301, 1263, 1111, 942  $cm^{-1}$ .

ESI HRMS  $m/z$  419.2604  $[M+H]^+$ , 441.2423  $[M+Na]^+$  (рассчитано для:  $C_{17}H_{35}N_6O_6^+$ , 419.2613;  $C_{17}H_{34}N_6O_6Na^+$ , 441.2432).

*Методика 3*

*6,6-Бис(5-азидо-2-оксапентил)-4,8-диокса-1,11-диазидоундекан (85)*

К смеси тетраола **81** (3 г, 8 ммоль) и триэтиламина (5.29 мл, 38 ммоль) в сухом дихлорметане (50 мл) по каплям добавляли метансулонила хлорид (4.23 г, 37 ммоль). Реакцию контролировали по ТСХ (10% EtOH в  $CHCl_3$ ,  $R_f$  = 0.79 тетраметилата). После того, как весь исходный спирт прореагировал, реакционную смесь промывали водой (2×50 мл), осушили над  $Na_2SO_4$ . После упаривания растворителя, полученное маслообразное вещество растворяли в сухом DMSO (30 мл) и добавляли азид натрия (7 г, 108 ммоль) при интенсивном перемешивании. Через 48 ч к реакционной смеси добавляли воду (30 мл) и экстрагировали продукт этилацетатом (3×100 мл). Органические фракции объединяли, промывали дистиллированной водой (5×100 мл) и осушали над  $Na_2SO_4$ . Оставшееся после упаривания растворителя в вакууме маслообразное вещество хроматографировали на силикагеле (градиент этанола в хлороформе от 0 до 2%). Получили целевой азид в виде желтоватой жидкости (3.40 г, 7.2 ммоль, выход 90%).

$^1H$ -ЯМР ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 1.83 (к, 8H,  $J$  = 6.3 Гц), 3.32–3.42 (м, 16H), 3.47 (т; 8H;  $J$  = 5.9 Гц).

$^{13}C$ -ЯМР ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 29.18, 45.52, 48.63, 68.0, 69.81.

ИК (чистый)  $\nu_{max}$  3334, 2928, 2871, 2802, 2097, 1486, 1460, 1372, 1301, 1263, 1112, 923  $cm^{-1}$ .

ESI HRMS  $m/z$ : 469.2734  $[M+H]^+$ , 491.2551  $[M+Na]^+$  (рассчитано для  $C_{17}H_{35}N_6O_6^+$ , 469.2742,  $C_{17}H_{34}N_6O_6Na^+$ , 491.2562).

*6,6-Бис(5-гидрокси-2-оксапентил)-4,8-диокса-11-гидроксиундец-1-илазид (82).*

По каплям добавляли мезилхлорид (7.06 г, 60 ммоль) к смеси тетраакис(5-гидрокси-2-оксапентил)метана (17.26 г, 50 ммоль) и триэтиламин (11.1 мл, 80 ммоль) в сухой ДХМ (300 мл). Реакцию контролировали методом ТСХ (10% EtOH в CHCl<sub>3</sub>; исходный спирт:  $R_f = 0.33$ ). После потребления всего исходного материала, реакционную смесь промывали дистиллированную воду (2×100 мл), рассол (3×50 мл) и высушивают Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Выпаривание растворителя в вакууме дало желтоватый цвет. маслянистая жидкость. Его растворяли в сухом DMSO (60 мл) и натрием. азид (10 г; 154 ммоль) добавляли при перемешивании на магнитной мешалке. Через 12 ч добавляли воду (120 мл) и смесь продуктов экстрагировали из водного слоя EtOAc (4×100 мл); органические фракции объединяли, промывали дистиллированной водой (5×100 мл), рассол (3×100 мл) и сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. После упаривание растворителя в вакууме, остаток хроматографировали на силикагеле (градиентное элюирование от 20 до 45% этанола в CHCl<sub>3</sub>). Получено бесцветное маслообразное вещество (5.24 г, выход 32%),  $R_f = 0.34$  (5% EtOH в CHCl<sub>3</sub>).

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц; CDCl<sub>3</sub>) δ 3.71 (т, 6H,  $J = 5.5$  Гц), 3.55 (т, 6H,  $J = 5.56$  Гц), 3.47 (уш с, 3H), 3.44 (т, 2H,  $J = 5.97$  Гц), 3.38 (с, 6H), 3.36–3.32 (м, 4H), 1.84–1.74 (м, 8H).

<sup>13</sup>C ЯМР (125 МГц; CDCl<sub>3</sub>) δ 70.9, 70.5, 70.4, 68.1, 61.5, 48.5, 44.8, 31.8, 29.0.

HRMS (ESI, m/z): рассчитано для C<sub>17</sub>H<sub>36</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub> ([M+H]<sup>+</sup>): 394.2548, найдено: 394.2557.



### 3.3. Синтез разветвлённых олигонуклеотидных конъюгатов из полиазидов

Трёх- и четырёхкомпонентные разветвленные олигонуклеотид-олигонуклеотидные конъюгаты синтезировали из разветвляющих реагентов – триазида, тетраазида и олигонуклеотидов с алкиновыми модификациями с использованием медь-катализируемой реакции азид-алкинового циклоприсоединения. Структура алкиновой модификации олигонуклеотида приведено на Рис. 58.

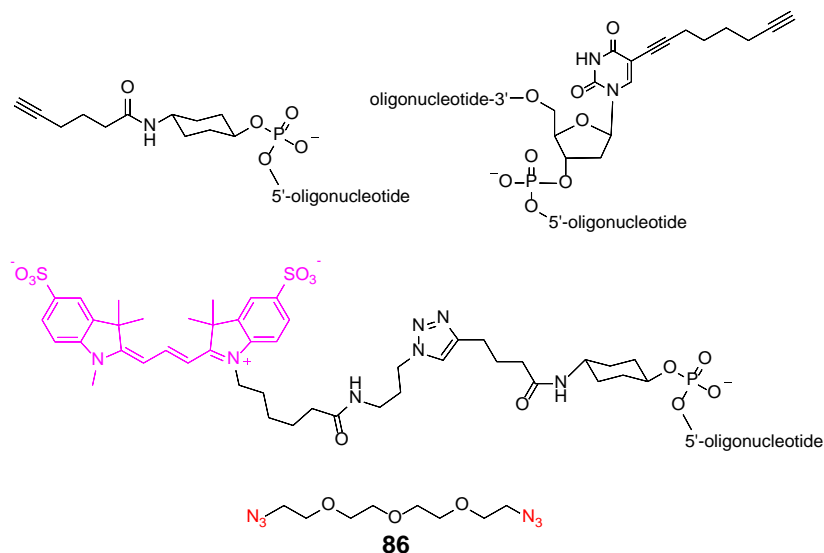


Рис. 58. Структуры модификаций олигонуклеотидов

Полная функционализация разветвляющих реагентов с тремя и четырьмя олигонуклеотидными фрагментами получали путем смешивания 5-кратного молярного избытка олигонуклеотидов с триазидом и 7-кратного избытка олигонуклеотида по отношению к тетраазиду **85**. Водный раствор олигонуклеотида и раствор соответствующего азид в DMSO в выбранном соотношении смешивали с буфером ТЕАА (рН 7) до конечной концентрации 0.2М буфера, 0.5 мМ аскорбиновой кислоты и 0.5 мМ смеси  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  с лигандом ТВТА в 55% DMSO. Общий объем реакционной смеси в 50% DMSO довели до 0.3 мл. Реакционную смесь дегазировали аргоном до и после добавления комплекса меди и оставляли на ночь при перемешивании. Продукты осаждали четырехкратным избытком 2% раствора перхлората лития в ацетоне. Анализ и разделение продуктов проводили с помощью ВЭЖХ и электрофореза в полиакриламидном геле (19% ПААГ для конъюгатов с  $T_{10}$ , 15% для продуктов, содержащих D11). Структура и стехиометрия разветвленных блоков подтверждена методом масс-спектрометрии.

### 3.4. Конъюгация красителей Cy3 и Cy5

Разветвленный конъюгат с остаточной азидной группой(ами) (1 нмоль) смешивали с 1.5-кратным избытком алкин-производного красителя (или 3-кратным избыток производного олигонуклеотида D11 в тех же условиях как описано выше для синтеза строительных блоков). Реакционную смесь оставляли на ночь и осаждали добавлением 2М раствора перхлората лития (200 мкл) и 4-кратного избытка ацетона. Продукт растворяли в 40 мкл воды MilliQ и анализировали/выделяли с помощью обращено-фазовой ВЭЖХ (для производных Cy) или ПААГ (для производных с олигонуклеотидом D11).

### 3.5. Синтез V-образных олигонуклеотидных конъюгатов

5'-Алкинмодифицированные олигонуклеотиды (Таблица 2) были синтезированы с использованием последовательностей из фрагмента ДНК гена фактора элонгации трансляции 1α *Fusarium avenaceum* (GenBank JF278604). Алкиновые модификации были введены с использованием соответствующих фосфорамидитов.

**Таблица 2.** Алкин-модифицированные олигонуклеотиды, использованные в работе.

ODN	Sequence, 5'→3'
<b>A1</b>	Alkyne-GGTCGCTTATCTGCACTCGGA
<b>A2</b>	Alkyne-TTGGTCGCTTATCTGCACTCGGA
<b>A3</b>	Alkyne-TTTTGGTCGCTTATCTGCACTCGGA
<b>A4</b>	Alkyne-TTTTTTGGTCGCTTATCTGCACTCGGA
<b>A5</b>	Alkyne-TTTTTTTTGGTCGCTTATCTGCACTCGGA
<b>B1</b>	Alkyne-TCCGAGTGCAGATAAGCGACC
<b>B2</b>	Alkyne-TTCCGAGTGCAGATAAGCGACC
<b>B3</b>	Alkyne-TTTTCCGAGTGCAGATAAGCGACC
<b>B4</b>	Alkyne-TTTTTTCCGAGTGCAGATAAGCGACC
<b>B5</b>	Alkyne-TTTTTTTTCCGAGTGCAGATAAGCGACC
<b>C</b>	Alkyne-ACGACTCGCTCCCTCATTCGA
<b>D</b>	Alkyne-TCGAATGAGGGAGCGAGTCGT
<b>E</b>	Alkyne-CTTACCCCGCCACTCGAGTGAC
<b>F</b>	Alkyne-GTCACTCGAGTGGCGGGGTAAG
<b>G</b>	GTGATTTTTTTTGGTGAGGTA(T <sup>Alkyne</sup> )CTTACCCCGCCACTCGAGT GAC
<b>H</b>	Alkyne-GTCACTCGAGTGGCGGGGTAAGATACCTCACCAAAAAA AATCAC

Некомплементарные линкерные последовательности Tn выделены курсивом; для структуры модификаций «Alkyne» и «T<sup>Alkyne</sup>» см. Рис. 58.

В пробирках объемом 2 мл растворяли в предварительно дегазированный деионизированной вод (15 мкл) алкин-модифицированные олигонуклеотидамы (40 нмоль), добавляли 2М буфер TEAA (15 мкл), DMSO (57.5 мкл) и азид в DMSO (10 мкл 1 мМ диазида **83** для симметричных V-образных блоков; 7.5 мкл 10 мМ азида сульфо-Cy3 для олигонуклеотидов, меченных сульфо Cy3; 10 мкл 40 мМ диазида **83** для

несимметричных V-образных блоков). Полученные смеси тщательно перемешивали и дегазировали в ротационном концентраторе в течение 2 мин с последующей продувкой аргоном. Затем добавляли смесь  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  с лигандом ТВТА в 55% водном DMSO (10 мМ, 15 мкл). Процедуру дегазации повторяли дважды и реакции запускали добавлением раствора аскорбиновой кислоты (10 мМ, 37.5 мкл). Плотно закрытые пробирки выдерживали в темноте в течение 8 ч. Реакционные смеси осаждали 2% перхлоратом лития в ацетоне (1.8 мл) при  $-20^\circ\text{C}$  в течение 1 ч. Осадки, полученные центрифугированием при 10 000 g промывали чистым ацетоном и сушили, затем растворяли в 50% формамиде (100 мкл). Анализ реакционных смесей проводили методом денатурирующего электроореза в 14% полиакриламидном геле ( $10 \times 10$  см, 8М мочевины,  $1 \times \text{TBE}$ -буфер), проводимого в течение 45 мин при постоянном напряжении 350 В. Полосы на гелях визуализировались по теньям на алюминиевых пластинах для ТСХ с предварительно нанесенным флуоресцентным покрытием (Merck F<sub>254</sub>) под лампой с длиной волны 254 нм. Продукты разделяли электрофорезом в денатурирующем 14% полиакриламидном геле. Полосы, содержащие продукты клик-реакций, осторожно вырезали скальпелем. Полученные срезы замораживали при  $-20^\circ\text{C}$ , измельчали и дважды элюировали деионизированной водой (всего 500 мкл). Элюаты обессоливали на гелевых колонках NAP-5 по стандартному протоколу. Чистота, состав и стехиометрия строительных блоков была подтверждена методом ВЭЖХ, аналитическим денатурирующим 14% ПААГ масс-спектрометрией с ионизацией электрораспылением.

**Таблица 3.** Состав и данные МС для полученных олигонуклеотид-олигонуклеотидных V-образных конъюгатов и олигонуклеотидов, меченных сульфо- $\text{Cu}_3$ .

Composition	Calcd $[\text{M}+\text{nH}]^+$	$[\text{M}+\text{nH}]^+$
(A1) <sub>2</sub>	13781.6	13778.8
(A2) <sub>2</sub>	14997.8	14994.9
(A3) <sub>2</sub>	16214.0	16211.2
(A4) <sub>2</sub>	17430.2	17427.3
(A5) <sub>2</sub>	18646.4	18643.5
(B1) <sub>2</sub>	13835.7	13832.9
(B2) <sub>2</sub>	15051.9	15048.0
(B3) <sub>2</sub>	16268.1	16265.2
(B4) <sub>2</sub>	17484.3	17481.3
(B5) <sub>2</sub>	18700.4	18697.5
<b>Cu3-A1</b>	7381.2	7384.8
<b>Cu3-A2</b>	7989.3	7991.8
<b>Cu3-A3</b>	8597.4	8602.0
<b>Cu3-A4</b>	9205.5	9211.4
<b>Cu3-A5</b>	9813.6	9821.6

### 3.6. Дискретные ДНК-наноструктур из гомо V-образных блоков

Гибридизацию V-образных блоков (Таблица 3) проводили в составах: (A1)<sub>2</sub>–(B1)<sub>2</sub>, (A2)<sub>2</sub>–(B2)<sub>2</sub>, (A3)<sub>2</sub>–(B3)<sub>2</sub>, (A4)<sub>2</sub>–(B4)<sub>2</sub>, (A5)<sub>2</sub>–(B5)<sub>2</sub>. Дополнительно мы гибридизовали V-образные блоки с комплементарными сульфо-Су3-меченными цепями (B1)<sub>2</sub>–(Су3-A1), (B2)<sub>2</sub>–(Су3-A2), (B3)<sub>2</sub>–(Су3-A3), (B4)<sub>2</sub>–(Су3-A4), (B5)<sub>2</sub>–(Су3-A5) для сравнения электрофоретической подвижности меченных Су3 V-образных дуплексов с ДНК-димерами наноэтиленового типа и исключают образование ДНК-димеров более высокого порядка. олигомеры. Исследовать влияние таких параметров, как состав буфера, скорость охлаждения и начальная концентрации конъюгатов олигонуклеотидов мы выбрали варианты, перечисленные ниже: Трис-ацетат с EDTA (1×ТАЕ), трис-ацетат с Mg<sup>2+</sup> (1× ТА-Mg) и два буфера содержащие этилендиамин, усиливающие образование наноструктур ДНК [282] (1×MES-EN и 1×ТА-EN), неконтролируемое мгновенное охлаждение от 95°C до 10°C и две разные скорости охлаждения в одном режиме: термоциклер – 5°C мин<sup>-1</sup> и 0.5°C мин<sup>-1</sup>; начальные концентрации гибридизующихся V-образных блоков – 0.05 мкМ, 0.5 мкМ и 5 мкМ. В пробирки объемом 0.2 мл загружали два 1 мкМ раствора исходного комплементарного V-образного олигонуклеотидные конъюгаты (5 мкл) и содержимое упаривали досуха с помощью роторного концентратор. Конечные концентрации исходных блоков были скорректированы с помощью соответствующих объемов. соответствующих буферов (1×ТАЕ, 1×ТА-Mg, 1×ТА-EN, 1×MES-EN, 1×ТА-Ni) до 0.05 мкМ, 0.5 мкМ и 5 мкМ. В зависимости от выбранных условий полученные растворы нагревали до 95°C и охлаждают тремя способами: мгновенно и постепенно при 5°C мин<sup>-1</sup> и 0.5°C мин<sup>-1</sup>. Состав полученных смесей анализировали с помощью денатурирующего ПААГ.

Состав буферов: 1× ТАЕ: 40 мМ Трис-основание, 20 мМ уксусная кислота, 1 мМ ЭДТА;  
 1× ТА-Mg: 40 мМ трис-основание, 20 мМ уксусная кислота, 1 мМ Mg<sup>2+</sup>;  
 1× ТА-Ni: 40 мМ Трис-основание, 20 мМ уксусная кислота, 1 мМ Ni<sup>2+</sup>;  
 1× ТА EN: 40 мМ трис-основание, 20 мМ уксусная кислота, 20 мМ этилендиамин;  
 1× MES EN: 50 мМ 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота, 20 мМ этилендиамин;  
 ТЭАА: 2 М ацетат триэтиламония с рН 7.

### 3.7. Синтез несимметричных V-образных блоков

Для синтеза несимметричных (гетеро-) V-образных конъюгатов разработали процедуру поэтапного присоединения двух разных олигонуклеотидов к точке ветвления. Этот подход состоял из последовательного проведения двух медь-катализируемых клик-реакций реагента **83** с двумя различными алкин-модифицированными олигонуклеотидами. На первом этапе использовался 10-кратный молярный избыток азида **2** с получением производных моноазидов. Избыток реагента разветвления **2** отмывали при переосаждении ацетоном и продукт вступал в реакцию со вторым алкин-содержащим олигонуклеотидом.

Для синтеза несимметричных блоков был проведен второй этап описанной выше клик-реакции. После осаждения перхлоратом лития в ацетоне в реакционные пробирки загружали 2М буфер ТЕАА (20 мкл), DMSO (90 мкл) и соответствующие алкин-модифицированные олигонуклеотиды (60 нмоль) в деионизированной воде (45 мкл). Полученные смеси тщательно перемешивали и дегазировали на ротационном концентраторе в течение 2 мин с последующей продувкой аргоном. К реакционным смесям добавляли DMSO (20 мкл) и 10 мМ раствор смеси  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ –ТВТА в 55% DMSO. Вышеописанные процедуры дегазации повторяли дважды и реакции запускали добавлением 20 мМ водного раствора аскорбиновой кислоты (25 мкл). Реакции анализировали путем денатурирующего электрофореза (8М мочевины, 1× буфер ТВЕ) в 14% полиакриламидном геле. Продукты разделяли с помощью электрофореза в денатурирующем 14% полиакриламидном геле, как описано ранее, и анализировали с помощью ESI MS.

Суммарные выходы очищенных блоков (оцененные по УФ-поглощению при 260 нм) варьировались от 35 до 50%. Все растворы несимметричных V-образных блоков (B1-G, A1-F, D-E, CH) доводили до исходной концентрации 1 мкМ деионизированной водой для дальнейшей гибридизации.

Начальные концентрации компонентов клик-реакций составляли: 200 мкМ (алкин-модифицированный олигонуклеотид), 65 мкМ (диазид **2**) для симметричных V-образных блоков; 500 мкМ для олигонуклеотидов, меченных сульфо Су3; 2 мМ диазид **2** для несимметричных V-образных блоков, 1 мМ ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ –ТВТА), 2.5 мМ (аскорбиновая кислота), 200 мМ (буфер ТЕАА).

### 3.8. Получение наномеров NM1 и NM2

Селективная сборка компактного дискретного элемента с помощью опоры ДНК-наноструктуры. Два 1 мкМ раствора комплементарных V-образных конъюгаты олигонуклеотидов (по 5 мкл каждый) загружали в 0.2 мл пробирок и их содержимое

упаривали досуха с помощью центробежный вакуумный концентратор. Конечные концентрации начального блоки корректировали с помощью 0.5 мкМ 1× MES-EN. Полученные растворы нагревали до 95°C и мгновенно охлаждали. Равные объемы (10 мкл) наномеров NM1 и NM2 в 1× MES-EN были смешивали при комнатной температуре и анализировали с использованием нативного PAGE через 30 мин.

### 3.9. Молекулярное моделирование олигонуклеотидных конъюгатов

Конъюгаты были построены с использованием программного обеспечения для молекулярной графики Sybyl-X пакет Certara. Все модели были построены в соответствии со следующими схемами. Изначально была разработана модель дуплексов ДНК с последовательностью A1×B1. Затем были созданы модели линкеров. Далее, концы дуплексов были соединены с концами линкеров. Полученные конструкции были оптимизированы с помощью Sybyl-X и метода Пауэлла со следующими настройками: параметры для межмолекулярные взаимодействия и значения парциальных зарядов принимались из силового поля Amber7ff99 для ДНК и из TRIPOS101 силовое поле для моделей линкера; расстояние отсечки несвязанного соединения было установить на 8 Å; количество итераций – 1000; симплексный метод использовался для первоначальной оптимизации; а 0.05 ккал·моль<sup>-1</sup>·Å<sup>-1</sup> – энергия критерий градиентной сходимости. Для расчета парциальных атомных зарядов линкеров использовали топологический метод Гастайгера-Хюккеля. Влияние среды учитывалось с помощью диэлектрической константы 8.

### 3.10. Атомно-силовая микроскопия

В качестве подложки для нанесения олигонуклеотидных наноструктур использовали поверхность высокоориентированного пиролитического графита (ВОПГ), модифицированную олигоглицин-углеводородным графитовым модификатором (ГМ), содержащим H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>CONH)<sub>5</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>-(CH<sub>2</sub>CONH)<sub>5</sub>-NH<sub>2</sub>. Для модификации ВОПГ каплю свежеприготовленного водного раствора ГМ концентрацией 0,01 мг/мл наносили на свежесколотую поверхность ВОПГ (качество ZYB, НТ-МДТ, Россия) примерно на 1 мин. После этого избыток жидкости удаляли потоком азота, смахивая каплю с поверхности. Для осаждения наноструктур каплю раствора образца в концентрации 10–50 мкг/мл объемом 1 мкл помещали на поверхность ГМ-ВОПГ на 1–10 с. Затем образец мягко промывали, помещая на 10 с каплю бидистиллированной воды объемом 50–100 мкл и удаляя ее с поверхности током азота. Особое внимание уделялось чистоте используемой воды. АСМ-изображения получали на воздухе с помощью многорежимного атомно-силового микроскопа Ntegra Prima (НТ-МДТ, Россия), работающего в прерывистом

контактном режиме. Использовались сверхострые АСМ-зонды (углеродные нанофидаменты с радиусом кривизны в несколько нанометров, выращенные на кончиках обычных кремниевых кантилеверов) с жесткостью пружины 5–30 Н/м. Сканирование осуществлялось при небольших амплитудах колебаний кантилевера в пределах 3–10 нм. Режим отталкивания использовался для получения максимально возможного разрешения АСМ при работе со сверхострыми кантилеверами; протокол более подробно описан ранее [283]. АСМ-изображения анализировались с использованием программного пакета Femtoscan Online ([www.nanocracy.net/en/Femtoscan-V.shtml](http://www.nanocracy.net/en/Femtoscan-V.shtml)).

### 3.11. Синтез олигонуклеотидных конъюгатов с кластерами GalNAc

Алкин-модифицированные олигонуклеотиды синтезировали на твердой фазе с последующей конъюгацией CuAAC на твердой фазе в присутствии 100 мМ CuI·P(OEt)<sub>3</sub> в DMAA (4×100 мкл, 2 ч). В случае конъюгации диазида и тетразида концентрация была увеличена до 50 мМ, чтобы исключить одновременное связывание с соседними олигонуклеотидами или с несколькими внутренними алкиновыми фрагментами. Гомо-Т-олигонуклеотиды отщепляли от носителя и снимали защиту с использованием обычного раствора АМА (концентрированный водный аммиак и 40% водный метиламин, 1:1 об./об.) в течение 30 мин при 65°C. Очистку и анализ ВЭЖХ проводили, как описано выше.

### 3.12. Синтез конъюгатов аптамеров с MMAE

В пробирки объемом 2 мл с алкин-модифицированными олигонуклеотидами (30 нмоль) добавляли предварительно дегазированную деионизированную воду (60 мкл), DMSO (60 мкл), аскорбиновую кислоту в 2М буфере TEAA (15 мкл) и азид в DMSO (5 мкл 100 мМ раствора для избытка диазида **86** или тетраазида **85** или 15 мкл 1 мМ раствора для недостатка тетраазида **85**). Полученную смесь тщательно перемешивали. К реакционной смеси добавляли 10 мМ раствор премикса CuSO<sub>4</sub>–TBTA в 55% водном DMSO (6 мкл). Плотные закрытые пробирки выдерживали в темноте в течение 3 ч при комнатной температуре. Реакционные смеси осаждали 2% LiClO<sub>4</sub> в ацетоне (1.5 мл) при -20°C в течение 30 мин. Центрифугировали при 10 000 gcf, получившийся осадок промывали чистым ацетоном, высушивали и растворяли в деионизированной воде (60 мкл). Полученную смесь азид-модифицированных олигонуклеотидов вводили в клик-реакцию по описанному выше протоколу с 2-кратным избытком **Alkyne-Val-Cit-PABC-MMAE**, по отношению к общему количеству азидогрупп. Через 3 ч реакционную смесь, осаждали 2% LiClO<sub>4</sub> в ацетоне (1.5 мл) при -20°C в течение 30 мин. Анализ реакционных смесей проводили с помощью денатурирующего электрофореза в 10% полиакриламидном геле (10×10 см, 8М мочевины, 1×TBE). Полосы на гелях визуализировали по теням на

предварительно покрытых алюминиевых пластинах ТСХ с флуоресцентным индикатором (Merck F<sub>254</sub>) с использованием УФ-света с  $\lambda=254$  нм. Продукты разделяли с помощью препаративного денатурирующего электрофореза в 10% или 15% полиакриламидном геле толщиной 4 мм (в зависимости от размера конъюгатов). Полосы, содержащие продукты клик-реакций, аккуратно вырезали скальпелем. Полученные срезы замораживали при -20 °С, измельчали и дважды элюировали деионизированной водой (всего 1000 мкл). Элюаты обессоливали с помощью гель-колонок NAP-10 в соответствии со стандартным протоколом. Чистоту аптамеров, модифицированных ММАЕ, определяли с помощью ВЭЖХ, аналитического денатурирующего 14%-ного ПААГ и электрораспылительной масс-спектрометрии.



## ВЫВОДЫ

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

## БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность научному руководителю Коршуну В.А. за постоянное руководство работой, помощь в планировании экспериментальной работы, подготовке и написании статей и диссертации. Отдельную благодарность автор выражает Зацепину Т.С. за ценные советы и практические рекомендации в области химии нуклеиновых кислот и олигонуклеотидных зондов, Устинову А.В. за помощь в планировании органических синтезов, проведении аналитических экспериментов, а также за обеспечение данной работы вспомогательными модифицирующими реагентами, красителями, олигонуклеотидами. Автор выражает благодарность Назаровой Е.В. за помощь в синтезе олигонуклеотидных конъюгатов с монометилауристатином Е, и Рябухиной Е.В. за исследование их биологической активности. Автор благодарит всех сотрудников лаборатории молекулярного дизайна и синтеза, в частности Апарина И.О. за помощь во флуоресцентной спектроскопии флуоресцентных веществ, зондов и съемку масс-спектров олигонуклеотидов, Чистова А.А. за ценные советы и помощь при проведении химических экспериментов данной работы, Сапожникову К.А. за помощь в получении олигонуклеотидных конъюгатов и их очистке. За помощь в проведении атомно-силовой микроскопии автор благодарит Клинова Д.В. и Баринова Н.А. За помощь в написании рукописи диссертации и автореферата, а также за тщательное редактирование текста автор благодарит Михуру И.В. Работа выполнена при поддержке Минобрнауки РФ (проект № 075-15-2024-561).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Brown, D.M.; Todd, A.R. Nucleic Acids. *Annu. Rev. Biochem.* **1955**, *24*, 311–338, doi:10.1146/annurev.bi.24.070155.001523.
2. Chargaff, E.; Lipshitz, R.; Green, C. Composition of the Desoxypentose Nucleic Acids of Four Genera of Sea-Urchin. *J. Biol. Chem.* **1952**, *195*, 155–160, doi:10.1016/S0021-9258(19)50884-5.
3. Watson, J.D.; Crick, F.H.C. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* **1953**, *171*, 737–738, doi:10.1038/171737a0.
4. Caruthers, M.H. The Chemical Synthesis of DNA/RNA: Our Gift to Science. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 1420–1427, doi:10.1074/jbc.X112.442855.
5. Hoose, A.; Vellacott, R.; Storch, M.; Freemont, P.S.; Ryadnov, M.G. DNA Synthesis Technologies to Close the Gene Writing Gap. *Nat. Rev. Chem.* **2023**, *7*, 144–161, doi:10.1038/s41570-022-00456-9.
6. Li, S.; Tan, W.; Jia, X.; Miao, Q.; Liu, Y.; Yang, D. Recent Advances in the Synthesis of Single-stranded DNA in Vitro. *Biotechnol. J.* **2024**, *19*, 2400026, doi:10.1002/biot.202400026.
7. Obexer, R.; Nassir, M.; Moody, E.R.; Baran, P.S.; Lovelock, S.L. Modern Approaches to Therapeutic Oligonucleotide Manufacturing. *Science* **2024**, *384*, ead14015, doi:10.1126/science.adl4015.
8. Beaucage, S.L.; Iyer, R.P. The Functionalization of Oligonucleotides Via Phosphoramidite Derivatives. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 1925–1963, doi:10.1016/S0040-4020(01)86295-5.
9. Beaucage, S.L.; Iyer, R.P. The Synthesis of Modified Oligonucleotides by the Phosphoramidite Approach and Their Applications. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 6123–6194, doi:10.1016/S0040-4020(01)87958-8.
10. Roy, S.; Caruthers, M. Synthesis of DNA/RNA and Their Analogs via Phosphoramidite and H-Phosphonate Chemistries. *Molecules* **2013**, *18*, 14268–14284, doi:10.3390/molecules181114268.
11. Klöcker, N.; Weissenboeck, F.P.; Rentmeister, A. Covalent Labeling of Nucleic Acids. *Chem. Soc. Rev.* **2020**, *49*, 8749–8773, doi:10.1039/D0CS00600A.
12. Lim, R.K.V.; Lin, Q. Bioorthogonal Chemistry: Recent Progress and Future Directions. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 1589, doi:10.1039/b925931g.
13. Bertozzi, C.R. A Decade of Bioorthogonal Chemistry. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 651–653, doi:10.1021/ar200193f.
14. Row, R.D.; Prescher, J.A. Constructing New Bioorthogonal Reagents and Reactions. *Acc. Chem. Res.* **2018**, *51*, 1073–1081, doi:10.1021/acs.accounts.7b00606.

15. Bird, R.E.; Lemmel, S.A.; Yu, X.; Zhou, Q.A. Bioorthogonal Chemistry and Its Applications. *Bioconjugate Chem.* **2021**, *32*, 2457–2479, doi:10.1021/acs.bioconjchem.1c00461.
16. Liu, Z.; Sun, M.; Zhang, W.; Ren, J.; Qu, X. Target-Specific Bioorthogonal Reactions for Precise Biomedical Applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2023**, *62*, e202308396, doi:10.1002/anie.202308396.
17. Scinto, S.L.; Bilodeau, D.A.; Hincapie, R.; Lee, W.; Nguyen, S.S.; Xu, M.; Am Ende, C.W.; Finn, M.G.; Lang, K.; Lin, Q.; et al. Bioorthogonal Chemistry. *Nat. Rev. Meth. Primers* **2021**, *1*, 30, doi:10.1038/s43586-021-00028-z.
18. Luu, T.; Gristwood, K.; Knight, J.C.; Jörg, M. Click Chemistry: Reaction Rates and Their Suitability for Biomedical Applications. *Bioconjugate Chem.* **2024**, *35*, 715–731, doi:10.1021/acs.bioconjchem.4c00084.
19. Schauenburg, D.; Weil, T. Chemical Reactions in Living Systems. *Adv. Sci.* **2024**, *11*, 2303396, doi:10.1002/advs.202303396.
20. Yang, B.; Cui, T.; Guo, L.; Dong, L.; Wu, J.; Xing, Y.; Xu, Y.; Chen, J.; Wang, Y.; Cui, Z.; et al. Advanced Smart Biomaterials for Regenerative Medicine and Drug Delivery Based on Phosphoramidite Chemistry: From Oligonucleotides to Precision Polymers. *Biomacromolecules* **2024**, *25*, 2701–2714, doi:10.1021/acs.biomac.4c00259.
21. Kellner, S.; Ochel, A.; Thüring, K.; Spenkuch, F.; Neumann, J.; Sharma, S.; Entian, K.-D.; Schneider, D.; Helm, M. Absolute and Relative Quantification of RNA Modifications via Biosynthetic Isotopomers. *Nucleic Acids Research* **2014**, *42*, e142–e142, doi:10.1093/nar/gku733.
22. McCown, P.J.; Ruskowska, A.; Kunkler, C.N.; Breger, K.; Hulewicz, J.P.; Wang, M.C.; Springer, N.A.; Brown, J.A. Naturally Occurring Modified Ribonucleosides. *WIREs RNA* **2020**, *11*, e1595, doi:10.1002/wrna.1595.
23. Kaiser, S.; Byrne, S.R.; Ammann, G.; Asadi Atoi, P.; Borland, K.; Brecheisen, R.; DeMott, M.S.; Gehrke, T.; Hagelskamp, F.; Heiss, M.; et al. Strategies to Avoid Artifacts in Mass Spectrometry-Based Epitranscriptome Analyses. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 23885–23893, doi:10.1002/anie.202106215.
24. Bessler, L.; Vogt, L.; Lander, M.; Dal Magro, C.; Keller, P.; Kühlbörn, J.; Kampf, C.J.; Opatz, T.; Helm, M. A New Bacterial Adenosine-Derived Nucleoside as an Example of RNA Modification Damage. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2023**, *62*, e202217128, doi:10.1002/anie.202217128.

25. Ammann, G.; Berg, M.; Dalwigk, J.F.; Kaiser, S.M. Pitfalls in RNA Modification Quantification Using Nucleoside Mass Spectrometry. *Acc. Chem. Res.* **2023**, *56*, 3121–3131, doi:10.1021/acs.accounts.3c00402.
26. Chen, Y.; Hong, T.; Wang, S.; Mo, J.; Tian, T.; Zhou, X. Epigenetic Modification of Nucleic Acids: From Basic Studies to Medical Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 2844–2872, doi:10.1039/C6CS00599C.
27. Bagert, J.D.; Muir, T.W. Molecular Epigenetics: Chemical Biology Tools Come of Age. *Annu. Rev. Biochem.* **2021**, *90*, 287–320, doi:10.1146/annurev-biochem-080120-021109.
28. Searle, B.; Müller, M.; Carell, T.; Kellett, A. Third-Generation Sequencing of Epigenetic DNA. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2023**, *62*, e202215704, doi:10.1002/anie.202215704.
29. Schärer, O.D. Chemistry and Biology of DNA Repair. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2946–2974, doi:10.1002/anie.200200523.
30. Chatterjee, N.; Walker, G.C. Mechanisms of DNA Damage, Repair, and Mutagenesis. *Envir. Mol. Mutagen.* **2017**, *58*, 235–263, doi:10.1002/em.22087.
31. Zhang, Q.; Su, C.; Qiu, J.-G.; Jiang, B.-H.; Zhang, C. Advances in Enzyme-Free Nucleic Acid Amplification-Based Fluorescent Biosensors for Real-Time Imaging of DNA Repair Enzymes in Living Cells. *Coordination Chemistry Reviews* **2023**, *496*, 215406, doi:10.1016/j.ccr.2023.215406.
32. Groelly, F.J.; Fawkes, M.; Dagg, R.A.; Blackford, A.N.; Tarsounas, M. Targeting DNA Damage Response Pathways in Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2023**, *23*, 78–94, doi:10.1038/s41568-022-00535-5.
33. Da Costa, A.A.B.A.; Chowdhury, D.; Shapiro, G.I.; D’Andrea, A.D.; Konstantinopoulos, P.A. Targeting Replication Stress in Cancer Therapy. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2023**, *22*, 38–58, doi:10.1038/s41573-022-00558-5.
34. Petropoulos, M.; Karamichali, A.; Rossetti, G.G.; Freudenmann, A.; Iacovino, L.G.; Dionellis, V.S.; Sotiriou, S.K.; Halazonetis, T.D. Transcription–Replication Conflicts Underlie Sensitivity to PARP Inhibitors. *Nature* **2024**, *628*, 433–441, doi:10.1038/s41586-024-07217-2.
35. Ranasinghe, R.T.; Brown, T. Fluorescence Based Strategies for Genetic Analysis. *Chem. Commun.* **2005**, 5487, doi:10.1039/b509522k.
36. Mackay, J.; Landt, O. Real-Time PCR Fluorescent Chemistries. In *Protocols for Nucleic Acid Analysis by Nonradioactive Probes*; Humana Press: New Jersey, 2007; Vol. 353, pp. 237–262 ISBN 978-1-59745-229-8.

37. Ranasinghe, R.T.; Brown, T. Ultrasensitive Fluorescence-Based Methods for Nucleic Acid Detection: Towards Amplification-Free Genetic Analysis. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 3717, doi:10.1039/c0cc04215c.
38. Fraga, D.; Meulia, T.; Fenster, S. Real-Time PCR. *CP Essential Lab. Tech.* **2014**, *8*, doi:10.1002/9780470089941.et1003s08.
39. Navarro, E.; Serrano-Heras, G.; Castaño, M.J.; Solera, J. Real-Time PCR Detection Chemistry. *Clinica Chimica Acta* **2015**, *439*, 231–250, doi:10.1016/j.cca.2014.10.017.
40. Heller, M.J. DNA Microarray Technology: Devices, Systems, and Applications. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2002**, *4*, 129–153, doi:10.1146/annurev.bioeng.4.020702.153438.
41. Beaudet, A.L.; Belmont, J.W. Array-Based DNA Diagnostics: Let the Revolution Begin. *Annu. Rev. Med.* **2008**, *59*, 113–129, doi:10.1146/annurev.med.59.012907.101800.
42. Sassolas, A.; Leca-Bouvier, B.D.; Blum, L.J. DNA Biosensors and Microarrays. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 109–139, doi:10.1021/cr0684467.
43. Bumgarner, R. Overview of DNA Microarrays: Types, Applications, and Their Future. *CP Molecular Biology* **2013**, *101*, doi:10.1002/0471142727.mb2201s101.
44. Kleiner, R.E.; Dumelin, C.E.; Liu, D.R. Small-Molecule Discovery from DNA-Encoded Chemical Libraries. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5707, doi:10.1039/c1cs15076f.
45. Dockerill, M.; Winssinger, N. DNA-Encoded Libraries: Towards Harnessing Their Full Power with Darwinian Evolution. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2023**, *62*, e202215542, doi:10.1002/anie.202215542.
46. Sahu, R.; Yadav, S.; Nath, S.; Banerjee, J.; Kapdi, A.R. DNA-Encoded Libraries via Late-Stage Functionalization Strategies: A Review. *Chem. Commun.* **2023**, *59*, 6128–6147, doi:10.1039/D3CC01075A.
47. Matsuo, B.; Granados, A.; Levitre, G.; Molander, G.A. Photochemical Methods Applied to DNA Encoded Library (DEL) Synthesis. *Acc. Chem. Res.* **2023**, *56*, 385–401, doi:10.1021/acs.accounts.2c00778.
48. Cui, M.; Nguyen, D.; Gaillez, M.P.; Heiden, S.; Lin, W.; Thompson, M.; Reddavid, F.V.; Chen, Q.; Zhang, Y. Trio-Pharmacophore DNA-Encoded Chemical Library for Simultaneous Selection of Fragments and Linkers. *Nat. Commun.* **2023**, *14*, 1481, doi:10.1038/s41467-023-37071-1.
49. Peterson, A.A.; Liu, D.R. Small-Molecule Discovery through DNA-Encoded Libraries. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2023**, *22*, 699–722, doi:10.1038/s41573-023-00713-6.
50. Zhang, S.; Zhang, H.; Liu, X.; Qi, P.; Tan, T.; Wang, S.; Gao, H.; Xu, H.; Zhou, Z.; Yi, W. Mask and Release Strategy-Enabled Diversity-Oriented Synthesis for DNA-Encoded Library. *Adv. Sci.* **2024**, *11*, 2307049, doi:10.1002/advs.202307049.

51. Mason, J.W.; Chow, Y.T.; Hudson, L.; Tutter, A.; Michaud, G.; Westphal, M.V.; Shu, W.; Ma, X.; Tan, Z.Y.; Coley, C.W.; et al. DNA-Encoded Library-Enabled Discovery of Proximity-Inducing Small Molecules. *Nat. Chem. Biol.* **2023**, doi:10.1038/s41589-023-01458-4.
52. A Protein-Templated Selection Approach for the Identification of Full Ligands from DNA-Encoded Libraries. *Nat. Chem.* **2024**, *16*, 487–488, doi:10.1038/s41557-024-01441-z.
53. Zhou, Y.; Shen, W.; Gao, Y.; Peng, J.; Li, Q.; Wei, X.; Liu, S.; Lam, F.S.; Mayol-Llinàs, J.; Zhao, G.; et al. Protein-Templated Ligand Discovery via the Selection of DNA-Encoded Dynamic Libraries. *Nat. Chem.* **2024**, *16*, 543–555, doi:10.1038/s41557-024-01442-y.
54. Famulok, M.; Hartig, J.S.; Mayer, G. Functional Aptamers and Aptazymes in Biotechnology, Diagnostics, and Therapy. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 3715–3743, doi:10.1021/cr0306743.
55. Dunn, M.R.; Jimenez, R.M.; Chaput, J.C. Analysis of Aptamer Discovery and Technology. *Nat. Rev. Chem.* **2017**, *1*, 0076, doi:10.1038/s41570-017-0076.
56. Röthlisberger, P.; Hollenstein, M. Aptamer Chemistry. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2018**, *134*, 3–21, doi:10.1016/j.addr.2018.04.007.
57. Zhu, G.; Chen, X. Aptamer-Based Targeted Therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2018**, *134*, 65–78, doi:10.1016/j.addr.2018.08.005.
58. Wang, T.; Chen, C.; Larcher, L.M.; Barrero, R.A.; Veedu, R.N. Three Decades of Nucleic Acid Aptamer Technologies: Lessons Learned, Progress and Opportunities on Aptamer Development. *Biotechnology Advances* **2019**, *37*, 28–50, doi:10.1016/j.biotechadv.2018.11.001.
59. Zhang, Y.; Lai, B.S.; Juhas, M. Recent Advances in Aptamer Discovery and Applications. *Molecules* **2019**, *24*, 941, doi:10.3390/molecules24050941.
60. Wu, L.; Wang, Y.; Xu, X.; Liu, Y.; Lin, B.; Zhang, M.; Zhang, J.; Wan, S.; Yang, C.; Tan, W. Aptamer-Based Detection of Circulating Targets for Precision Medicine. *Chem. Rev.* **2021**, *121*, 12035–12105, doi:10.1021/acs.chemrev.0c01140.
61. Krissanaprasit, A.; Key, C.M.; Pontula, S.; LaBean, T.H. Self-Assembling Nucleic Acid Nanostructures Functionalized with Aptamers. *Chem. Rev.* **2021**, *121*, 13797–13868, doi:10.1021/acs.chemrev.0c01332.
62. Venkatesan, S.; Chanda, K.; Balamurali, M.M. Recent Advancements of Aptamers in Cancer Therapy. *ACS Omega* **2023**, *8*, 32231–32243, doi:10.1021/acsomega.3c04345.
63. Weaver, S.; Mohammadi, M.H.; Nakatsuka, N. Aptamer-Functionalized Capacitive Biosensors. *Biosens. Bioelectron.* **2023**, *224*, 115014, doi:10.1016/j.bios.2022.115014.

64. Xie, S.; Sun, W.; Fu, T.; Liu, X.; Chen, P.; Qiu, L.; Qu, F.; Tan, W. Aptamer-Based Targeted Delivery of Functional Nucleic Acids. *J. Am. Chem. Soc.* **2023**, *145*, 7677–7691, doi:10.1021/jacs.3c00841.
65. Brown, A.; Brill, J.; Amini, R.; Nurmi, C.; Li, Y. Development of Better Aptamers: Structured Library Approaches, Selection Methods, and Chemical Modifications. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2024**, *63*, e202318665, doi:10.1002/anie.202318665.
66. Stuber, A.; Nakatsuka, N. Aptamer Renaissance for Neurochemical Biosensing. *ACS Nano* **2024**, *18*, 2552–2563, doi:10.1021/acsnano.3c09576.
67. Mohammadinejad, A.; Gaman, L.E.; Aleyaghoob, G.; Gaceu, L.; Mohajeri, S.A.; Moga, M.A.; Badea, M. Aptamer-Based Targeting of Cancer: A Powerful Tool for Diagnostic and Therapeutic Aims. *Biosensors* **2024**, *14*, 78, doi:10.3390/bios14020078.
68. Egli, M.; Manoharan, M. Chemistry, Structure and Function of Approved Oligonucleotide Therapeutics. *Nucleic Acids Research* **2023**, *51*, 2529–2573, doi:10.1093/nar/gkad067.
69. Shi, Y.; Zhen, X.; Zhang, Y.; Li, Y.; Koo, S.; Saiding, Q.; Kong, N.; Liu, G.; Chen, W.; Tao, W. Chemically Modified Platforms for Better RNA Therapeutics. *Chem. Rev.* **2024**, *124*, 929–1033, doi:10.1021/acs.chemrev.3c00611.
70. Jadhav, V.; Vaishnav, A.; Fitzgerald, K.; Maier, M.A. RNA Interference in the Era of Nucleic Acid Therapeutics. *Nat. Biotechnol.* **2024**, *42*, 394–405, doi:10.1038/s41587-023-02105-y.
71. Hofman, C.R.; Corey, D.R. Targeting RNA with Synthetic Oligonucleotides: Clinical Success Invites New Challenges. *Cell Chemical Biology* **2024**, *31*, 125–138, doi:10.1016/j.chembiol.2023.09.005.
72. Kovecses, O.; Mercier, F.E.; McKeague, M. Nucleic Acid Therapeutics as Differentiation Agents for Myeloid Leukemias. *Leukemia* **2024**, *38*, 1441–1454, doi:10.1038/s41375-024-02191-0.
73. Vinjamuri, B.P.; Pan, J.; Peng, P. A Review on Commercial Oligonucleotide Drug Products. *J. Pharm. Sci.* **2024**, *113*, 1749–1768, doi:10.1016/j.xphs.2024.04.021.
74. Dovgan, I.; Koniev, O.; Kolodych, S.; Wagner, A. Antibody–Oligonucleotide Conjugates as Therapeutic, Imaging, and Detection Agents. *Bioconjugate Chem.* **2019**, *30*, 2483–2501, doi:10.1021/acs.bioconjchem.9b00306.
75. Adler, M. Immuno-PCR as A Clinical Laboratory Tool. In *Advances in Clinical Chemistry*; Elsevier, 2005; Vol. 39, pp. 239–292 ISBN 978-0-12-010339-3.
76. Chang, L.; Li, J.; Wang, L. Immuno-PCR: An Ultrasensitive Immunoassay for Biomolecular Detection. *Analytica Chimica Acta* **2016**, *910*, 12–24, doi:10.1016/j.aca.2015.12.039.



77. Trads, J.B.; Tørring, T.; Gothelf, K.V. Site-Selective Conjugation of Native Proteins with DNA. *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50*, 1367–1374, doi:10.1021/acs.accounts.6b00618.
78. Ang, Y.S.; Yung, L.-Y.L. Protein-to-DNA Converter with High Signal Gain. *ACS Nano* **2024**, *18*, 10454–10463, doi:10.1021/acsnano.3c11435.
79. Dugal-Tessier, J.; Thirumalairajan, S.; Jain, N. Antibody-Oligonucleotide Conjugates: A Twist to Antibody-Drug Conjugates. *JCM* **2021**, *10*, 838, doi:10.3390/jcm10040838.
80. Roberts, T.C.; Wood, M.J.A.; Davies, K.E. Therapeutic Approaches for Duchenne Muscular Dystrophy. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2023**, *22*, 917–934, doi:10.1038/s41573-023-00775-6.
81. Mullard, A. Antibody–Oligonucleotide Conjugates Enter the Clinic. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2022**, *21*, 6–8, doi:10.1038/d41573-021-00213-5.
82. Malecova, B.; Burke, R.S.; Cochran, M.; Hood, M.D.; Johns, R.; Kovach, P.R.; Doppalapudi, V.R.; Erdogan, G.; Arias, J.D.; Darimont, B.; et al. Targeted Tissue Delivery of RNA Therapeutics Using Antibody–Oligonucleotide Conjugates (AOCs). *Nucleic Acids Research* **2023**, *51*, 5901–5910, doi:10.1093/nar/gkad415.
83. Halseth, A.; Ackermann, E.; Brandt, T.; Chen, C.; Cho, H.; Stahl, M.; DiTrapani, K.; Hughes, S.; Tawil, R.; Statland, J. P51 Phase 1/2 Study to Evaluate AOC 1020 for Adult Patients with Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy: FORTITUDE Trial Design. *Neuromuscular Disorders* **2023**, *33*, S71, doi:10.1016/j.nmd.2023.07.032.
84. Tang, A.; Yokota, T. Duchenne Muscular Dystrophy: Promising Early-Stage Clinical Trials to Watch. *Exp. Opin. Invest. Drugs* **2024**, *33*, 201–217, doi:10.1080/13543784.2024.2313105.
85. Seeman, N.C. Nucleic Acid Junctions and Lattices. *J. Theor. Biol.* **1982**, *99*, 237–247, doi:10.1016/0022-5193(82)90002-9.
86. Chidchob, P.; Sleiman, H.F. Recent Advances in DNA Nanotechnology. *Cur. Opin. Chem. Biol.* **2018**, *46*, 63–70, doi:10.1016/j.cbpa.2018.04.012.
87. Dey, S.; Fan, C.; Gothelf, K.V.; Li, J.; Lin, C.; Liu, L.; Liu, N.; Nijenhuis, M.A.D.; Saccà, B.; Simmel, F.C.; et al. DNA Origami. *Nat. Rev. Meth. Primers* **2021**, *1*, 13, doi:10.1038/s43586-020-00009-8.
88. Seeman, N.C.; Sleiman, H.F. DNA Nanotechnology. *Nat. Rev. Mater.* **2017**, *3*, 17068, doi:10.1038/natrevmats.2017.68.
89. Zhang, T.; Hartl, C.; Frank, K.; Heuer-Jungemann, A.; Fischer, S.; Nickels, P.C.; Nickel, B.; Liedl, T. 3D DNA Origami Crystals. *Adv. Mater.* **2018**, *30*, 1800273, doi:10.1002/adma.201800273.

90. Kong, H.; Sun, B.; Yu, F.; Wang, Q.; Xia, K.; Jiang, D. Exploring the Potential of Three-Dimensional DNA Crystals in Nanotechnology: Design, Optimization, and Applications. *Adv. Sci.* **2023**, *10*, 2302021, doi:10.1002/advs.202302021.
91. Ijäs, H.; Nummelin, S.; Shen, B.; Kostianen, M.A.; Linko, V. Dynamic DNA Origami Devices: From Strand-Displacement Reactions to External-Stimuli Responsive Systems. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 2114, doi:10.3390/ijms19072114.
92. Endo, M.; Sugiyama, H. DNA Origami Nanomachines. *Molecules* **2018**, *23*, 1766, doi:10.3390/molecules23071766.
93. Ji, J.; Karna, D.; Mao, H. DNA Origami Nano-Mechanics. *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50*, 11966–11978, doi:10.1039/D1CS00250C.
94. Wang, J.; Li, Z.; Willner, I. Dynamic Reconfigurable DNA Nanostructures, Networks and Materials. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2023**, *62*, e202215332, doi:10.1002/anie.202215332.
95. Xiao, M.; Lai, W.; Man, T.; Chang, B.; Li, L.; Chandrasekaran, A.R.; Pei, H. Rationally Engineered Nucleic Acid Architectures for Biosensing Applications. *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 11631–11717, doi:10.1021/acs.chemrev.9b00121.
96. Zhang, P.; Ouyang, Y.; Zhuo, Y.; Chai, Y.; Yuan, R. Recent Advances in DNA Nanostructures Applied in Sensing Interfaces and Cellular Imaging. *Anal. Chem.* **2023**, *95*, 407–419, doi:10.1021/acs.analchem.2c04540.
97. Zhu, Y.; Wu, J.; Zhou, Q. Functional DNA Sensors Integrated with Nucleic Acid Signal Amplification Strategies for Non-Nucleic Acid Targets Detection. *Biosens. Bioelectron.* **2023**, *230*, 115282, doi:10.1016/j.bios.2023.115282.
98. Chen, Z.; Liu, C.; Cao, F.; Ren, J.; Qu, X. DNA Metallization: Principles, Methods, Structures, and Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47*, 4017–4072, doi:10.1039/C8CS00011E.
99. Li, K.; Liu, Y.; Lou, B.; Tan, Y.; Chen, L.; Liu, Z. DNA-Guided Metallization of Nanomaterials and Their Biomedical Applications. *Molecules* **2023**, *28*, 3922, doi:10.3390/molecules28093922.
100. Yang, S.; Bögel, B.W.A.; Wang, F.; Xu, C.; Dou, H.; Mann, S.; Fan, C.; De Greef, T.F.A. DNA as a Universal Chemical Substrate for Computing and Data Storage. *Nat. Rev. Chem.* **2024**, *8*, 179–194, doi:10.1038/s41570-024-00576-4.
101. Jiang, W.; Li, J.; Lin, Z.; Guo, J.; Ma, J.; Wang, Z.; Zhang, M.; Wu, Y. Recent Advances of DNA Origami Technology and Its Application in Nanomaterial Preparation. *Small Structures* **2023**, *4*, 2200376, doi:10.1002/ssstr.202200376.

102. Zhan, P.; Peil, A.; Jiang, Q.; Wang, D.; Mousavi, S.; Xiong, Q.; Shen, Q.; Shang, Y.; Ding, B.; Lin, C.; et al. Recent Advances in DNA Origami-Engineered Nanomaterials and Applications. *Chem. Rev.* **2023**, *123*, 3976–4050, doi:10.1021/acs.chemrev.3c00028.
103. Xing, Y.; Rottensteiner, A.; Ciccone, J.; Howorka, S. Functional Nanopores Enabled with DNA. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2023**, *62*, e202303103, doi:10.1002/anie.202303103.
104. Bae, W.; Kocabey, S.; Liedl, T. DNA Nanostructures in Vitro, in Vivo and on Membranes. *Nano Today* **2019**, *26*, 98–107, doi:10.1016/j.nantod.2019.03.001.
105. Hernandez-Garcia, A. Strategies to Build Hybrid Protein–DNA Nanostructures. *Nanomaterials* **2021**, *11*, 1332, doi:10.3390/nano11051332.
106. Stephanopoulos, N. Hybrid Nanostructures from the Self-Assembly of Proteins and DNA. *Chem* **2020**, *6*, 364–405, doi:10.1016/j.chempr.2020.01.012.
107. Yao, G.; Zhang, F.; Wang, F.; Peng, T.; Liu, H.; Poppleton, E.; Šulc, P.; Jiang, S.; Liu, L.; Gong, C.; et al. Meta-DNA Structures. *Nat. Chem.* **2020**, *12*, 1067–1075, doi:10.1038/s41557-020-0539-8.
108. Grass, R.N.; Heckel, R.; Puddu, M.; Paunescu, D.; Stark, W.J. Robust Chemical Preservation of Digital Information on DNA in Silica with Error-Correcting Codes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 2552–2555, doi:10.1002/anie.201411378.
109. Hao, Y.; Li, Q.; Fan, C.; Wang, F. Data Storage Based on DNA. *Small Structures* **2021**, *2*, 2000046, doi:10.1002/ssstr.202000046.
110. Ren, Y.; Zhang, Y.; Liu, Y.; Wu, Q.; Su, J.; Wang, F.; Chen, D.; Fan, C.; Liu, K.; Zhang, H. DNA-Based Concatenated Encoding System for High-Reliability and High-Density Data Storage. *Small Methods* **2022**, *6*, 2101335, doi:10.1002/smt.202101335.
111. Wang, S.; Mao, X.; Wang, F.; Zuo, X.; Fan, C. Data Storage Using DNA. *Advanced Materials* **2024**, *36*, 2307499, doi:10.1002/adma.202307499.
112. Knappe, G.A.; Wamhoff, E.-C.; Bathe, M. Functionalizing DNA Origami to Investigate and Interact with Biological Systems. *Nat. Rev. Mater.* **2022**, *8*, 123–138, doi:10.1038/s41578-022-00517-x.
113. Wang, Y.; Xiong, Y.; Shi, K.; Effah, C.Y.; Song, L.; He, L.; Liu, J. DNA Nanostructures for Exploring Cell–Cell Communication. *Chem. Soc. Rev.* **2024**, *53*, 4020–4044, doi:10.1039/D3CS00944K.
114. Jiang, Q.; Liu, S.; Liu, J.; Wang, Z.; Ding, B. Rationally Designed DNA-Origami Nanomaterials for Drug Delivery In Vivo. *Adv. Mater.* **2019**, *31*, 1804785, doi:10.1002/adma.201804785.
115. Jiang, Q.; Shang, Y.; Xie, Y.; Ding, B. DNA Origami: From Molecular Folding Art to Drug Delivery Technology. *Adv. Mater.* **2024**, *36*, 2301035, doi:10.1002/adma.202301035.

116. Udomprasert, A.; Kangsamaksin, T. DNA Origami Applications in Cancer Therapy. *Cancer Science* **2017**, *108*, 1535–1543, doi:10.1111/cas.13290.
117. Zhang, S.; Lou, X.; Liu, L.; Yang, Y. The Creation of DNA Origami-Based Supramolecular Nanostructures for Cancer Therapy. *Adv Healthcare Materials* **2023**, *12*, 2301066, doi:10.1002/adhm.202301066.
118. Hu, Y.; Duan, Y.; Salaita, K. DNA Nanotechnology for Investigating Mechanical Signaling in the Immune System. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2023**, *62*, e202302967, doi:10.1002/anie.202302967.
119. Liu, Y.; West, S.C. Happy Hollidays: 40th Anniversary of the Holliday Junction. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2004**, *5*, 937–944, doi:10.1038/nrm1502.
120. Zuo, H.; Mao, C. A Minimalist's Approach for DNA Nanoconstructions. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2019**, *147*, 22–28, doi:10.1016/j.addr.2019.02.002.
121. Piantanida, L.; Liddle, J.A.; Hughes, W.L.; Majikes, J.M. DNA Nanostructure Decoration: A How-to Tutorial. *Nanotechnology* **2024**, *35*, 273001, doi:10.1088/1361-6528/ad2ac5.
122. Shi, J.; Bergstrom, D.E. Assembly of Novel DNA Cycles with Rigid Tetrahedral Linkers. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*, 111–113, doi:10.1002/anie.199701111.
123. Grimau, M.G.; Iacopino, D.; Aviñó, A.; de la Torre, B.G.; Ongaro, A.; Fitzmaurice, D.; Wessels, J.; Eritja, R. Synthesis of Branched Oligonucleotides as Templates for the Assembly of Nanomaterials. *Helvetica Chimica Acta* **2003**, *86*, 2814–2826, doi:10.1002/hlca.200390232.
124. Aviñó, A.; Grimau, M.G.; Frieden, M.; Eritja, R. Synthesis and Triple-Helix-Stabilization Properties of Branched Oligonucleotides Carrying 8-Amino adenine Moieties. *Helvetica Chimica Acta* **2004**, *87*, 303–316, doi:10.1002/hlca.200490028.
125. Ueno, Y.; Shibata, A.; Matsuda, A.; Kitade, Y. Synthesis of 3'-3'-Linked Oligonucleotides Branched by a Pentaerythritol Linker and the Thermal Stabilities of the Triplexes with Single-Stranded DNA or RNA. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 684–689, doi:10.1021/bc020059q.
126. Alterman, J.F.; Godinho, B.M.D.C.; Hassler, M.R.; Ferguson, C.M.; Echeverria, D.; Sapp, E.; Haraszti, R.A.; Coles, A.H.; Conroy, F.; Miller, R.; et al. A Divalent siRNA Chemical Scaffold for Potent and Sustained Modulation of Gene Expression throughout the Central Nervous System. *Nat. Biotechnol.* **2019**, *37*, 884–894, doi:10.1038/s41587-019-0205-0.
127. Ryazantsev, D.Y.; Tsybulsky, D.A.; Prokhorenko, I.A.; Kvach, M.V.; Martynenko, Y.V.; Philipchenko, P.M.; Shmanai, V.V.; Korshun, V.A.; Zavriev, S.K. Two-Dye and One- or Two-Quencher DNA Probes for Real-Time PCR Assay: Synthesis and Comparison with a

- TaqMan<sup>TM</sup> Probe. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *404*, 59–68, doi:10.1007/s00216-012-6114-4.
128. 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. *Synthetic Communications* **1996**, *26*, 2531–2547, doi:10.1080/00397919608004566.
129. [Http://Www.Rjbc.Ru/Arc/24/10/0794-0797.Pdf](http://www.rjbc.ru/Arc/24/10/0794-0797.pdf).
130. Shchepinov, M. Oligonucleotide Dendrimers: Synthesis and Use as Polylabelled DNA Probes. *Nucleic Acids Research* **1997**, *25*, 4447–4454, doi:10.1093/nar/25.22.4447.
131. Kawamoto, Y.; Liu, W.; Yum, J.H.; Park, S.; Sugiyama, H.; Takahashi, Y.; Takakura, Y. Enhanced Immunostimulatory Activity of Covalent DNA Dendrons. *ChemBioChem* **2022**, *23*, e202100583, doi:10.1002/cbic.202100583.
132. Zhu, C.; Wang, W.; Wang, Y.; Zhang, Y.; Li, J. Dendronized DNA Chimeras Harness Scavenger Receptors To Degrade Cell Membrane Proteins. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2023**, *62*, e202300694, doi:10.1002/anie.202300694.
133. Scheffler, M.; Dorenbeck, A.; Jordan, S.; Wüstefeld, M.; Von Kiedrowski, G. Self-Assembly of Trisoligonucleotidyls: The Case for Nano-Acetylene and Nano-Cyclobutadiene. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 3311–3315, doi:10.1002/(SICI)1521-3773(19991115)38:22<3311::AID-ANIE3311>3.0.CO;2-2.
134. Kawamoto, Y.; Wu, Y.; Park, S.; Hidaka, K.; Sugiyama, H.; Takahashi, Y.; Takakura, Y. Multivalent Dendritic DNA Aptamer Molecules for the Enhancement of Therapeutic Effects. *Chem. Commun.* **2024**, *60*, 6256–6259, doi:10.1039/D4CC00578C.
135. Katajisto, J.; Heinonen, P.; Lönnberg, H. Solid-Phase Synthesis of Oligonucleotide Glycoconjugates Bearing Three Different Glycosyl Groups: Orthogonally Protected Bis(Hydroxymethyl)-*N,N'*-Bis(3-Hydroxypropyl)Malondiamide Phosphoramidite as Key Building Block. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 7609–7615, doi:10.1021/jo048984o.
136. Kim, J.; Weledji, Y.N.; Greenberg, M.M. Independent Generation and Characterization of a C2'-Oxidized Abasic Site in Chemically Synthesized Oligonucleotides. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 6100–6104, doi:10.1021/jo049033d.
137. Raddatz, S. Hydrazide Oligonucleotides: New Chemical Modification for Chip Array Attachment and Conjugation. *Nucleic Acids Research* **2002**, *30*, 4793–4802, doi:10.1093/nar/gkf594.
138. Kim, S.J.; Bang, E.-K.; Kim, B.H. Synthesis of Novel Phosphoramidite Building Blocks from Pentaerythritol. *Synlett* **2003**, 1838–1840, doi:10.1055/s-2003-41406.
139. Dubber, M.; Fréchet, J.M.J. Solid-Phase Synthesis of Multivalent Glycoconjugates on a DNA Synthesizer. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 239–246, doi:10.1021/bc0256244.

140. Utagawa, E.; Ohkubo, A.; Sekine, M.; Seio, K. Synthesis of Branched Oligonucleotides with Three Different Sequences Using an Oxidatively Removable Tritylthio Group. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 8259–8266, doi:10.1021/jo071173a.
141. Seio, K.; Kanamori, T.; Sekine, M. Synthesis of Branched DNA Using Oxidatively Cleavable Tritylsulfonyl as a Hydroxy Protecting Group. *CP Nucleic Acid Chemistry* **2014**, *58*, doi:10.1002/0471142700.nc0218s58.
142. Zimmermann, J.; Cebulla, M.P.J.; Mönninghoff, S.; von Kiedrowski, G. Self-Assembly of a DNA Dodecahedron from 20 Trisoligonucleotides with  $C_{3h}$  Linkers. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3626–3630, doi:10.1002/anie.200702682.
143. Karskela, M.; Helkearo, M.; Virta, P.; Lönnberg, H. Synthesis of Oligonucleotide Glycoconjugates Using Sequential Click and Oximation Ligations. *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 748–755, doi:10.1021/bc900529g.
144. Kuroda, T.; Sakurai, Y.; Suzuki, Y.; Nakamura, A.O.; Kuwahara, M.; Ozaki, H.; Sawai, H. Assembly of DNA Nanostructures with Branched Tris-DNA. *Chem. Asian J.* **2006**, *1*, 575–580, doi:10.1002/asia.200600088.
145. Tumpane, J.; Sandin, P.; Kumar, R.; Powers, V.E.C.; Lundberg, E.P.; Gale, N.; Baglioni, P.; Lehn, J.-M.; Albinsson, B.; Lincoln, P.; et al. Addressable High-Information-Density DNA Nanostructures. *Chem. Phys. Lett.* **2007**, *440*, 125–129, doi:10.1016/j.cplett.2007.04.018.
146. Gothelf, K.V.; Thomsen, A.; Nielsen, M.; Cló, E.; Brown, R.S. Modular DNA-Programmed Assembly of Linear and Branched Conjugated Nanostructures. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1044–1046, doi:10.1021/ja038333u.
147. Nielsen, M.; Thomsen, A.H.; Cló, E.; Kirpekar, F.; Gothelf, K.V. Synthesis of Linear and Tripoidal Oligo(Phenylene Ethynylene)-Based Building Blocks for Application in Modular DNA-Programmed Assembly. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 2240–2250, doi:10.1021/jo035764m.
148. Pathak, R.; Marx, A. An Adamantane-Based Building Block for DNA Networks. *Chemistry An Asian Journal* **2011**, *6*, 1450–1455, doi:10.1002/asia.201000887.
149. Franzini, R.M.; Kool, E.T. Two Successive Reactions on a DNA Template: A Strategy for Improving Background Fluorescence and Specificity in Nucleic Acid Detection. *Chemistry Eur. J.* **2011**, *17*, 2168–2175, doi:10.1002/chem.201002426.
150. Ligeour, C.; Meyer, A.; Vasseur, J.; Morvan, F. Bis- and Tris-Alkyne Phosphoramidites for Multiple 5'-Labeling of Oligonucleotides by Click Chemistry. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, *2012*, 1851–1856, doi:10.1002/ejoc.201101763.

151. Eryazici, I.; Yildirim, I.; Schatz, G.C.; Nguyen, S.T. Enhancing the Melting Properties of Small Molecule-DNA Hybrids through Designed Hydrophobic Interactions: An Experimental-Computational Study. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 7450–7458, doi:10.1021/ja300322a.
152. Shaller, A.D.; Wan, W.; Zhao, B.; Li, A.D.Q. Chromophoric and Dendritic Phosphoramidites Enable Construction of Functional Dendrimers with Exceptional Brightness and Water Solubility. *Chemistry Eur. J.* **2014**, *20*, 12165–12171, doi:10.1002/chem.201403445.
153. Panagiotidis, C.; Kath-Schorr, S.; von Kiedrowski, G. Flexibility of  $C_{3h}$ -Symmetrical Linkers in Tris-oligonucleotide-Based Tetrahedral Scaffolds. *ChemBioChem* **2016**, *17*, 254–259, doi:10.1002/cbic.201500436.
154. Striebel, H.-M.; Birch-Hirschfeld, E.; Egerer, R.; Földes-Papp, Z.; Tilz, G.P.; Stelzner, A. Enhancing Sensitivity of Human Herpes Virus Diagnosis with DNA Microarrays Using Dendrimers. *Exp. Mol. Pathol.* **2004**, *77*, 89–97, doi:10.1016/j.yexmp.2004.05.004.
155. Oliviero, G.; Borbone, N.; Galeone, A.; Varra, M.; Piccialli, G.; Mayol, L. Synthesis and Characterization of a Bunchy Oligonucleotide Forming a Monomolecular Parallel Quadruplex Structure in Solution. *Tetrahedron Letters* **2004**, *45*, 4869–4872, doi:10.1016/j.tetlet.2004.04.149.
156. Oliviero, G.; Amato, J.; Borbone, N.; Galeone, A.; Petraccone, L.; Varra, M.; Piccialli, G.; Mayol, L. Synthesis and Characterization of Monomolecular DNA G-Quadruplexes Formed by Tetra-End-Linked Oligonucleotides. *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 889–898, doi:10.1021/bc060009b.
157. Wang, G.; Abramov, M.; Van Aerschot, A.; Rozenski, J.; Lei, S.; Klymchenko, A.; Van der Auweraer, M.; De Feyter, S.; Herdewijn, P. Dendritic Nucleotides: Interaction with an Aliphatic Acid Monolayer. *Chem. Biodiv.* **2008**, *5*, 1675–1682, doi:10.1002/cbdv.200890156.
158. Conlon, P.; Yang, C.J.; Wu, Y.; Chen, Y.; Martinez, K.; Kim, Y.; Stevens, N.; Marti, A.A.; Jockusch, S.; Turro, N.J.; et al. Pyrene Excimer Signaling Molecular Beacons for Probing Nucleic Acids. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 336–342, doi:10.1021/ja076411y.
159. Oliviero, G.; Borbone, N.; Amato, J.; D'Errico, S.; Galeone, A.; Piccialli, G.; Varra, M.; Mayol, L. Synthesis of Quadruplex-forming Tetra-end-linked Oligonucleotides: Effects of the Linker Size on Quadruplex Topology and Stability. *Biopolymers* **2009**, *91*, 466–477, doi:10.1002/bip.21153.
160. Ugarte-Urbe, B.; Pérez-Rentero, S.; Lucas, R.; Aviñó, A.; Reina, J.J.; Alkorta, I.; Eritja, R.; Morales, J.C. Synthesis, Cell-Surface Binding, and Cellular Uptake of Fluorescently

- Labeled Glucose–DNA Conjugates with Different Carbohydrate Presentation. *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 1280–1287, doi:10.1021/bc100079n.
161. Aviñó, A.; Ocampo, S.M.; Perales, J.C.; Eritja, R. Synthesis and *in Vitro* Inhibition Properties of siRNA Conjugates Carrying Acridine and Quindoline Moieties. *Chem. Biodiv.* **2012**, *9*, 557–566, doi:10.1002/cbdv.201100321.
162. Dutta, S.; Fülöp, A.; Mokhir, A. Fluorogenic, Catalytic, Photochemical Reaction for Amplified Detection of Nucleic Acids. *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24*, 1533–1542, doi:10.1021/bc400152n.
163. Vengut-Climent, E.; Terrazas, M.; Lucas, R.; Arévalo-Ruiz, M.; Eritja, R.; Morales, J.C. Synthesis, RNAi Activity and Nuclease-Resistant Properties of Apolar Carbohydrates siRNA Conjugates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 4048–4051, doi:10.1016/j.bmcl.2013.05.065.
164. Díaz, J.A.; Gibbs-Davis, J.M. Sharpening the Thermal Release of DNA from Nanoparticles: Towards a Sequential Release Strategy. *Small* **2013**, *9*, 2862–2871, doi:10.1002/smll.201202278.
165. Fokina, A.A.; Poletaeva, Yu.E.; Burakova, E.A.; Bakulina, A.Yu.; Zatsepin, T.S.; Ryabchikova, E.I.; Stetsenko, D.A. Template-Assisted Assembly of DNA Nanostructures from Branched Oligonucleotides. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2021**, *47*, 700–712, doi:10.1134/S1068162021030067.
166. Zharkov, T.D.; Mironova, E.M.; Markov, O.V.; Zhukov, S.A.; Khodyreva, S.N.; Kupryushkin, M.S. Fork- and Comb-like Lipophilic Structures: Different Chemical Approaches to the Synthesis of Oligonucleotides with Multiple Dodecyl Residues. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 14637, doi:10.3390/ijms241914637.
167. Fokina, A.; Poletaeva, Y.; Dukova, S.; Klabenkova, K.; Rad'kova, Z.; Bakulina, A.; Zatsepin, T.; Ryabchikova, E.; Stetsenko, D. Template-Assisted Assembly of Hybrid DNA/RNA Nanostructures Using Branched Oligodeoxy- and Oligoribonucleotides. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 15978, doi:10.3390/ijms242115978.
168. Hariharan, V.N.; Shin, M.; Chang, C.-W.; O'Reilly, D.; Biscans, A.; Yamada, K.; Guo, Z.; Somasundaran, M.; Tang, Q.; Monopoli, K.; et al. Divalent siRNAs Are Bioavailable in the Lung and Efficiently Block SARS-CoV-2 Infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2023**, *120*, e2219523120, doi:10.1073/pnas.2219523120.
169. Cheng, S.-Y.; Caiazzi, J.; Biscans, A.; Alterman, J.F.; Echeverria, D.; McHugh, N.; Hassler, M.; Jolly, S.; Giguere, D.; Cipi, J.; et al. Single Intravitreal Administration of a Tetravalent siRNA Exhibits Robust and Efficient Gene Silencing in Mouse and Pig



- Photoreceptors. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2024**, *35*, 102088, doi:10.1016/j.omtn.2023.102088.
170. Shchepinov, M.S.; Mir, K.U.; Elder, J.K.; Frank-Kamenetskii, M.D.; Southern, E.M. Oligonucleotide Dendrimers: Stable Nano-Structures. *Nucleic Acids Research* **1999**, *27*, 3035–3041, doi:10.1093/nar/27.15.3035.
171. Li, Z. Multiple Thiol-Anchor Capped DNA-Gold Nanoparticle Conjugates. *Nucleic Acids Research* **2002**, *30*, 1558–1562, doi:10.1093/nar/30.7.1558.
172. Marshall, J.D. Novel Chimeric Immunomodulatory Compounds Containing Short CpG Oligodeoxyribonucleotides Have Differential Activities in Human Cells. *Nucleic Acids Research* **2003**, *31*, 5122–5133, doi:10.1093/nar/gkg700.
173. 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*, 2342–2350, doi:10.1021/ac071291y.
174. Lee, K.; Rouillard, J.; Kim, B.; Gulari, E.; Kim, J. Conjugated Polymers Combined with a Molecular Beacon for Label-Free and Self-Signal-Amplifying DNA Microarrays. *Adv. Funct. Mater.* **2009**, *19*, 3317–3325, doi:10.1002/adfm.200901175.
175. Lovell, J.F.; Chen, J.; Huynh, E.; Jarvi, M.T.; Wilson, B.C.; Zheng, G. Facile Synthesis of Advanced Photodynamic Molecular Beacon Architectures. *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 1023–1025, doi:10.1021/bc100178z.
176. Ferreira, R.; Alvira, M.; Aviñó, A.; Gómez-Pinto, I.; González, C.; Gabelica, V.; Eritja, R. Synthesis and Structural Characterization of Stable Branched DNA G-Quadruplexes Using the Trebler Phosphoramidite. *ChemistryOpen* **2012**, *1*, 106–114, doi:10.1002/open.201200009.
177. Chang, C.I.; Lee, T.Y.; Kim, S.; Sun, X.; Hong, S.W.; Yoo, J.W.; Dua, P.; Kang, H.S.; Kim, S.; Li, C.J.; et al. Enhanced Intracellular Delivery and Multi-target Gene Silencing Triggered by Tripodal RNA Structures. *J. Gene Med.* **2012**, *14*, 138–146, doi:10.1002/jgm.1653.
178. Hong, B.J.; Cho, V.Y.; Bleher, R.; Schatz, G.C.; Nguyen, S.T. Enhancing DNA-Mediated Assemblies of Supramolecular Cage Dimers through Tuning Core Flexibility and DNA Length—A Combined Experimental–Modeling Study. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 13381–13388, doi:10.1021/jacs.5b08678.
179. Jadhav, S.; Yim, C.-B.; Rajander, J.; Grönroos, T.J.; Solin, O.; Virta, P. Solid-Supported Porphyrins Useful for the Synthesis of Conjugates with Oligomeric Biomolecules. *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27*, 1023–1029, doi:10.1021/acs.bioconjchem.6b00051.

180. Prakash, T.P.; Yu, J.; Migawa, M.T.; Kinberger, G.A.; Wan, W.B.; Østergaard, M.E.; Carty, R.L.; Vasquez, G.; Low, A.; Chappell, A.; et al. Comprehensive Structure–Activity Relationship of Triantennary *N*-Acetylgalactosamine Conjugated Antisense Oligonucleotides for Targeted Delivery to Hepatocytes. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 2718–2733, doi:10.1021/acs.jmedchem.5b01948.
181. Yang, B.; Zhao, Z.; Pan, Y.; Xie, J.; Zhou, B.; Li, Y.; Dong, Y.; Liu, D. Shear-Thinning and Designable Responsive Supramolecular DNA Hydrogels Based on Chemically Branched DNA. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2021**, *13*, 48414–48422, doi:10.1021/acsami.1c15494.
182. Distler, M.E.; Teplensky, M.H.; Bujold, K.E.; Kusmierz, C.D.; Evangelopoulos, M.; Mirkin, C.A. DNA Dendrons as Agents for Intracellular Delivery. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 13513–13518, doi:10.1021/jacs.1c07240.
183. Hofmeister, A.; Jahn-Hofmann, K.; Brunner, B.; Helms, M.W.; Metz-Weidmann, C.; Krack, A.; Kurz, M.; Li, Z.; Weitzenberg, M.M.; Pflimlin, E.; et al. Syntheses of Morpholine-Based Nucleotide Analogs for Hepatic siRNA Targeting and Stabilization. *J. Med. Chem.* **2021**, *64*, 6838–6855, doi:10.1021/acs.jmedchem.1c00144.
184. Valsangkar, V.; Vangaveti, S.; Lee, G.W.; Fahssi, W.M.; Awan, W.S.; Huang, Y.; Chen, A.A.; Sheng, J. Structural and Binding Effects of Chemical Modifications on Thrombin Binding Aptamer (TBA). *Molecules* **2021**, *26*, 4620, doi:10.3390/molecules26154620.
185. Li, J.; Zhang, Z.; Gu, J.; Amini, R.; Mansfield, A.G.; Xia, J.; White, D.; Stacey, H.D.; Ang, J.C.; Panesar, G.; et al. Three on Three: Universal and High-Affinity Molecular Recognition of the Symmetric Homotrimeric Spike Protein of SARS-CoV-2 with a Symmetric Homotrimeric Aptamer. *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144*, 23465–23473, doi:10.1021/jacs.2c09870.
186. Mor, A.; Suliman, S.; Ben-Yishay, R.; Yunger, S.; Brody, Y.; Shav-Tal, Y. Dynamics of Single mRNP Nucleocytoplasmic Transport and Export through the Nuclear Pore in Living Cells. *Nat Cell Biol* **2010**, *12*, 543–552, doi:10.1038/ncb2056.
187. Nakagawa, O.; Ming, X.; Carver, K.; Juliano, R. Conjugation with Receptor-Targeted Histidine-Rich Peptides Enhances the Pharmacological Effectiveness of Antisense Oligonucleotides. *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 165–170, doi:10.1021/bc400500h.
188. Thaner, R.V.; Eryazici, I.; Farha, O.K.; Mirkin, C.A.; Nguyen, S.T. Facile One-Step Solid-Phase Synthesis of Multitopic Organic–DNA Hybrids via “Click” Chemistry. *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 1091–1096, doi:10.1039/C3SC53206B.
189. Prakash, T.P.; Brad Wan, W.; Low, A.; Yu, J.; Chappell, A.E.; Gaus, H.; Kinberger, G.A.; Østergaard, M.E.; Migawa, M.T.; Swayze, E.E.; et al. Solid-Phase Synthesis of 5'-

- Triantennary N-Acetylgalactosamine Conjugated Antisense Oligonucleotides Using Phosphoramidite Chemistry. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 4127–4130, doi:10.1016/j.bmcl.2015.08.019.
190. Kim, Y.; Yin, P. Enhancing Biocompatible Stability of DNA Nanostructures Using Dendritic Oligonucleotides and Brick Motifs. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 700–703, doi:10.1002/anie.201911664.
191. Moreno, P.M.D.; Cortinhas, J.; Martins, A.S.; Pêgo, A.P. Engineering a Novel Self-Assembled Multi-siRNA Nanocaged Architecture with Controlled Enzyme-Mediated siRNA Release. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2022**, *14*, 56483–56497, doi:10.1021/acsami.2c15086.
192. Pan, Y.; Yang, B.; Xu, R.; Li, X.; Dong, Y.; Liu, D. Rigidity-Dependent Formation Process of DNA Supramolecular Hydrogels. *NPG Asia Mater.* **2022**, *14*, 92, doi:10.1038/s41427-022-00445-w.
193. Tumpane, J.; Kumar, R.; Lundberg, E.P.; Sandin, P.; Gale, N.; Nandhakumar, I.S.; Albinsson, B.; Lincoln, P.; Wilhelmsson, L.M.; Brown, T.; et al. Triplex Addressability as a Basis for Functional DNA Nanostructures. *Nano Lett.* **2007**, *7*, 3832–3839, doi:10.1021/nl072512i.
194. Sandin, P.; Lincoln, P.; Albinsson, B. Conformational Flexibility in DNA Nanoconstructs: A Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer Study. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 13089–13094, doi:10.1021/jp801790c.
195. Lundberg, E.P.; Plesa, C.; Wilhelmsson, L.M.; Lincoln, P.; Brown, T.; Nordén, B. Nanofabrication Yields. Hybridization and Click-Fixation of Polycyclic DNA Nanoassemblies. *ACS Nano* **2011**, *5*, 7565–7575, doi:10.1021/nn202568q.
196. Hannestad, J.K.; Gerrard, S.R.; Brown, T.; Albinsson, B. Self-Assembled DNA-Based Fluorescence Waveguide with Selectable Output. *Small* **2011**, *7*, 3178–3185, doi:10.1002/smll.201101144.
197. D’Agostino, M.R.; Li, J.; Zhang, Z.; Gu, J.; Marzok, A.; Ang, J.; Bujold, K.E.; Afkhami, S.; Xia, X.; Li, Y.; et al. Respiratory Mucosal Administration of DNA Aptamer Nanomaterials Protects against Antigenically Diverse SARS-CoV-2 Variants. **2024**, doi:10.1101/2024.05.31.596896.
198. Debacker, A.J.; Voutila, J.; Catley, M.; Blakey, D.; Habib, N. Delivery of Oligonucleotides to the Liver with GalNAc: From Research to Registered Therapeutic Drug. *Molecular Therapy* **2020**, *28*, 1759–1771, doi:10.1016/j.ymthe.2020.06.015.
199. An, G. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of GalNAc-Conjugated siRNAs. *J. Clin. Pharm.* **2024**, *64*, 45–57, doi:10.1002/jcph.2337.

200. Kim, H.; Kim, S.; Lee, D.; Lee, D.; Yoon, J.; Lee, H. Oligonucleotide Therapeutics and Their Chemical Modification Strategies for Clinical Applications. *J. Pharm. Investig.* **2024**, *54*, 415–433, doi:10.1007/s40005-024-00669-8.
201. Nair, J.K.; Willoughby, J.L.S.; Chan, A.; Charisse, K.; Alam, Md.R.; Wang, Q.; Hoekstra, M.; Kandasamy, P.; Kel'in, A.V.; Milstein, S.; et al. Multivalent *N*-Acetylgalactosamine-Conjugated siRNA Localizes in Hepatocytes and Elicits Robust RNAi-Mediated Gene Silencing. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 16958–16961, doi:10.1021/ja505986a.
202. Sharma, V.K.; Osborn, M.F.; Hassler, M.R.; Echeverria, D.; Ly, S.; Ulashchik, E.A.; Martynenko-Makaev, Y.V.; Shmanai, V.V.; Zatsepin, T.S.; Khvorova, A.; et al. Novel Cluster and Monomer-Based GalNAc Structures Induce Effective Uptake of siRNAs in Vitro and in Vivo. *Bioconjugate Chem.* **2018**, *29*, 2478–2488, doi:10.1021/acs.bioconjchem.8b00365.
203. Bhingardeve, P.; Madhanagopal, B.R.; Naick, H.; Jain, P.; Manoharan, M.; Ganesh, K. Receptor-Specific Delivery of Peptide Nucleic Acids Conjugated to Three Sequentially Linked *N*-Acetyl Galactosamine Moieties into Hepatocytes. *J. Org. Chem.* **2020**, *85*, 8812–8824, doi:10.1021/acs.joc.0c00601.
204. Li, Q.; Dong, M.; Chen, P. Novel Diamine-Scaffold Based *N*-Acetylgalactosamine (GalNAc)–siRNA Conjugate: Synthesis and *in Vivo* Activities. *RSC Adv.* **2024**, *14*, 17461–17466, doi:10.1039/D4RA03023K.
205. Kandasamy, P.; Mori, S.; Matsuda, S.; Erande, N.; Datta, D.; Willoughby, J.L.S.; Taneja, N.; O'Shea, J.; Bisbe, A.; Manoharan, R.M.; et al. Metabolically Stable Anomeric Linkages Containing GalNAc–siRNA Conjugates: An Interplay among ASGPR, Glycosidase, and RISC Pathways. *J. Med. Chem.* **2023**, *66*, 2506–2523, doi:10.1021/acs.jmedchem.2c01337.
206. Matsuda, S.; Keiser, K.; Nair, J.K.; Charisse, K.; Manoharan, R.M.; Kretschmer, P.; Peng, C.G.; V. Kel'in, A.; Kandasamy, P.; Willoughby, J.L.S.; et al. siRNA Conjugates Carrying Sequentially Assembled Trivalent *N*-Acetylgalactosamine Linked Through Nucleosides Elicit Robust Gene Silencing *In Vivo* in Hepatocytes. *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 1181–1187, doi:10.1021/cb501028c.
207. Rajeev, K.G.; Nair, J.K.; Jayaraman, M.; Charisse, K.; Taneja, N.; O'Shea, J.; Willoughby, J.L.S.; Yucius, K.; Nguyen, T.; Shulga-Morskaya, S.; et al. Hepatocyte-Specific Delivery of siRNAs Conjugated to Novel Non-nucleosidic Trivalent *N*-Acetylgalactosamine Elicits Robust Gene Silencing in Vivo. *ChemBioChem* **2015**, *16*, 903–908, doi:10.1002/cbic.201500023.
208. Nair, J.K.; Attarwala, H.; Sehgal, A.; Wang, Q.; Aluri, K.; Zhang, X.; Gao, M.; Liu, J.; Indrakanti, R.; Schofield, S.; et al. Impact of Enhanced Metabolic Stability on

- Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of GalNAc–siRNA Conjugates. *Nucleic Acids Research* **2017**, *45*, 10969–10977, doi:10.1093/nar/gkx818.
209. Clewe, O.; Rekić, D.; Quartino, A.L.; Carlsson, B.; Higashimori, M.; Wernevik, L.; Hofherr, A.; Rydén-Bergsten, T.; Nilsson, C.; Knöchel, J. Population Pharmacokinetics of a Novel *PCSK9* Antisense Oligonucleotide. *Brit. J. Clin. Pharm.* **2024**, *90*, 1503–1513, doi:10.1111/bcp.16046.
  210. Willoughby, J.L.S.; Chan, A.; Sehgal, A.; Butler, J.S.; Nair, J.K.; Racie, T.; Shulga-Morskaya, S.; Nguyen, T.; Qian, K.; Yucius, K.; et al. Evaluation of GalNAc-siRNA Conjugate Activity in Pre-Clinical Animal Models with Reduced Asialoglycoprotein Receptor Expression. *Molecular Therapy* **2018**, *26*, 105–114, doi:10.1016/j.ymthe.2017.08.019.
  211. Janas, M.M.; Schlegel, M.K.; Harbison, C.E.; Yilmaz, V.O.; Jiang, Y.; Parmar, R.; Zlatev, I.; Castoreno, A.; Xu, H.; Shulga-Morskaya, S.; et al. Selection of GalNAc-Conjugated siRNAs with Limited off-Target-Driven Rat Hepatotoxicity. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 723, doi:10.1038/s41467-018-02989-4.
  212. Baker, B.F.; Xia, S.; Partridge, W.; Engelhardt, J.A.; Tsimikas, S.; Crooke, S.T.; Bhanot, S.; Geary, R.S. Safety and Tolerability of GalNAc<sub>3</sub>-Conjugated Antisense Drugs Compared to the Same-Sequence 2'-O-Methoxyethyl-Modified Antisense Drugs: Results from an Integrated Assessment of Phase 1 Clinical Trial Data. *Nucleic Acid Therapeutics* **2024**, *34*, 18–25, doi:10.1089/nat.2023.0026.
  213. Yu, M.; Qin, J.; Liu, X.; Ramsden, D.; Williams, B.; Zlatev, I.; Guenther, D.; Matsuda, S.; Tymon, R.; Darcy, J.; et al. Evaluating the Oral Delivery of GalNAc-Conjugated siRNAs in Rodents and Non-Human Primates. *Nucleic Acids Research* **2024**, *52*, 5423–5437, doi:10.1093/nar/gkae350.
  214. Neumayer, C.; Ng, D.; Requena, D.; Jiang, C.S.; Qureshi, A.; Vaughan, R.; Prakash, T.P.; Revenko, A.; Simon, S.M. GalNAc-Conjugated siRNA Targeting the DNAJB1-PRKACA Fusion Junction in Fibrolamellar Hepatocellular Carcinoma. *Molecular Therapy* **2024**, *32*, 140–151, doi:10.1016/j.ymthe.2023.11.012.
  215. Baker, B.F.; Xia, S.; Partridge, W.; Kwoh, T.J.; Tsimikas, S.; Bhanot, S.; Geary, R.S. Integrated Assessment of Phase 2 Data on GalNAc<sub>3</sub>-Conjugated 2'-O-Methoxyethyl-Modified Antisense Oligonucleotides. *Nucl. Acid Ther.* **2023**, *33*, 72–80, doi:10.1089/nat.2022.0044.
  216. Wu, X.; Yu, J.; Ge, B.; Wang, J.; Han, X.; Zhang, C.; Mao, X.; Kalluru, H.; Bramson, C.; Terra, S.G.; et al. A Randomized, Open-Label, Phase I, Single-Dose Study of Antisense

- Oligonucleotide, Vupanorsen, in Chinese Adults with Elevated Triglycerides. *Drugs R D* **2024**, *24*, 253–262, doi:10.1007/s40268-024-00467-5.
217. El-Sagheer, A.H.; Brown, T. Click Chemistry with DNA. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1388, doi:10.1039/b901971p.
218. Ustinov, A.V.; Stepanova, I.A.; Dubnyakova, V.V.; Zatsepin, T.S.; Nozhevnikova, E.V.; Korshun, V.A. Modification of Nucleic Acids Using [3 + 2]-Dipolar Cycloaddition of Azides and Alkynes. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2010**, *36*, 401–445, doi:10.1134/S1068162010040011.
219. Haque, M.M.; Peng, X. DNA-Associated Click Chemistry. *Sci. China Chem.* **2014**, *57*, 215–231, doi:10.1007/s11426-013-5035-1.
220. Fantoni, N.Z.; El-Sagheer, A.H.; Brown, T. A Hitchhiker's Guide to Click-Chemistry with Nucleic Acids. *Chem. Rev.* **2021**, *121*, 7122–7154, doi:10.1021/acs.chemrev.0c00928.
221. Fomich, M.A.; Kvach, M.V.; Navakouski, M.J.; Weise, C.; Baranovsky, A.V.; Korshun, V.A.; Shmanai, V.V. Azide Phosphoramidite in Direct Synthesis of Azide-Modified Oligonucleotides. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 4590–4593, doi:10.1021/ol502155g.
222. Wang, K.; Wang, D.; Ji, K.; Chen, W.; Zheng, Y.; Dai, C.; Wang, B. Post-Synthesis DNA Modifications Using a Trans-Cyclooctene Click Handle. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 909–915, doi:10.1039/C4OB02031F.
223. Spampinato, A.; Kužmová, E.; Pohl, R.; Sýkorová, V.; Vrábel, M.; Kraus, T.; Hocek, M. *Trans* -Cyclooctene- and Bicyclononyne-Linked Nucleotides for Click Modification of DNA with Fluorogenic Tetrazines and Live Cell Metabolic Labeling and Imaging. *Bioconjugate Chem.* **2023**, acs.bioconjchem.3c00064, doi:10.1021/acs.bioconjchem.3c00064.
224. Lee, J.K.; Jung, Y.H.; Stoltenberg, R.M.; Tok, J.B.-H.; Bao, Z. Synthesis of DNA–Organic Molecule–DNA Triblock Oligomers Using the Amide Coupling Reaction and Their Enzymatic Amplification. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12854–12855, doi:10.1021/ja8044458.
225. Lee, J.K.; Jung, Y.H.; Tok, J.B.-H.; Bao, Z. Syntheses of Organic Molecule–DNA Hybrid Structures. *ACS Nano* **2011**, *5*, 2067–2074, doi:10.1021/nn1032455.
226. Latorre, A.; Lorca, R.; Zamora, F.; Somoza, Á. Enhanced Fluorescence of Silver Nanoclusters Stabilized with Branched Oligonucleotides. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 4950, doi:10.1039/c3cc40446c.
227. Astakhova, I.K.; Santhosh Kumar, T.; Campbell, M.A.; Ustinov, A.V.; Korshun, V.A.; Wengel, J. Branched DNA Nanostructures Efficiently Stabilised and Monitored by Novel

- Pyrene–Perylene 2'- $\alpha$ - L -Amino-LNA FRET Pairs. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 511–513, doi:10.1039/C2CC37547H.
228. Brunner, K.; Harder, J.; Halbach, T.; Willibald, J.; Spada, F.; Gnerlich, F.; Sparrer, K.; Beil, A.; Möckl, L.; Bräuchle, C.; et al. Cell-Penetrating and Neurotargeting Dendritic siRNA Nanostructures. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 1946–1949, doi:10.1002/anie.201409803.
229. Hong, B.J.; Eryazici, I.; Bleher, R.; Thaner, R.V.; Mirkin, C.A.; Nguyen, S.T. Directed Assembly of Nucleic Acid-Based Polymeric Nanoparticles from Molecular Tetravalent Cores. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 8184–8191, doi:10.1021/jacs.5b03485.
230. Clavé, G.; Chatelain, G.; Filoramo, A.; Gasparutto, D.; Saint-Pierre, C.; Le Cam, E.; Piétrement, O.; Guérineau, V.; Campidelli, S. Synthesis of a Multibranching Porphyrin–Oligonucleotide Scaffold for the Construction of DNA-Based Nano-Architectures. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 2778–2783, doi:10.1039/C4OB00202D.
231. Liu, J.; Wang, R.; Ma, D.; Ouyang, D.; Xi, Z. Efficient Construction of Stable Gene Nanoparticles through Polymerase Chain Reaction with Flexible Branched Primers for Gene Delivery. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 9208–9211, doi:10.1039/C5CC01788B.
232. Cheng, L.; Deng, H.; Ma, D.; Zhai, B.; Zhang, Q.; Li, L.; Xi, Z. Branch-PCR Constructed TP53 Gene Nanovector for Potential Cancer Therapy. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 9687–9690, doi:10.1039/C8CC05066J.
233. Liu, J.; Wang, R.; Ma, D.; Li, Y.; Wei, C.; Xi, Z. Branch-PCR Constructed Stable shRNA Transcription Nanoparticles Have Long-Lasting RNAi Effect. *ChemBioChem* **2016**, *17*, 1038–1042, doi:10.1002/cbic.201600047.
234. Sartor, V.; Irvoas, J.; Bordeau, G.; Chouini-Lalanne, N. Multivalent Azide-Functionalized Polypyridyl Ruthenium Complexes and Their DNA Conjugates through Click Chemistry. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2017**, *2017*, 2661–2670, doi:10.1002/ejic.201700174.
235. Trinh, T.; Saliba, D.; Liao, C.; de Rochambeau, D.; Prinzen, A.L.; Li, J.; Sleiman, H.F. “Printing” DNA Strand Patterns on Small Molecules with Control of Valency, Directionality, and Sequence. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 3042–3047, doi:10.1002/anie.201809251.
236. Martynenko-Makaev, Yu.V.; Udodova, V.V.; Sharko, O.L.; Shmanai, V.V. Synthesis of Pentaerythritol-Based Branching Reagents for Modification of Proteins and Nucleic Acids by [2+3] Dipolar Cycloaddition Reaction. *Russ. J. Gen. Chem.* **2018**, *88*, 452–461, doi:10.1134/S1070363218030118.
237. Liu, J.; Lu, X.; Wu, T.; Wu, X.; Han, L.; Ding, B. Branched Antisense and siRNA Co-Assembled Nanoplatform for Combined Gene Silencing and Tumor Therapy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 1853–1860, doi:10.1002/anie.202011174.

238. Geng, Z.; Wang, L.; Liu, K.; Liu, J.; Tan, W. Enhancing anti-PD-1 Immunotherapy by Nanomicelles Self-Assembled from Multivalent Aptamer Drug Conjugates. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 15459–15465, doi:10.1002/anie.202102631.
239. Li, Y.; Pei, J.; Lu, X.; Jiao, Y.; Liu, F.; Wu, X.; Liu, J.; Ding, B. Hierarchical Assembly of Super-DNA Origami Based on a Flexible and Covalent-Bound Branched DNA Structure. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 19893–19900, doi:10.1021/jacs.1c09472.
240. Saliba, D.; Trinh, T.; Lachance-Brais, C.; Prinzen, A.L.; Rizzuto, F.J.; De Rochambeau, D.; Sleiman, H.F. Asymmetric Patterning Drives the Folding of a Tripodal DNA Nanotweezer. *Chem. Sci.* **2022**, *13*, 74–80, doi:10.1039/D1SC04793K.
241. Faiad, S.; Laurent, Q.; Prinzen, A.L.; Asohan, J.; Saliba, D.; Toader, V.; Sleiman, H.F. Impact of the Core Chemistry of Self-Assembled Spherical Nucleic Acids on Their *In Vitro* Fate. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2023**, *62*, e202315768, doi:10.1002/anie.202315768.
242. Sun, H.; Zhu, X.; Lu, P.Y.; Rosato, R.R.; Tan, W.; Zu, Y. Oligonucleotide Aptamers: New Tools for Targeted Cancer Therapy. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2014**, *3*, e182, doi:10.1038/mtna.2014.32.
243. Vorobyeva, M.; Vorobjev, P.; Venyaminova, A. Multivalent Aptamers: Versatile Tools for Diagnostic and Therapeutic Applications. *Molecules* **2016**, *21*, 1613, doi:10.3390/molecules21121613.
244. Riccardi, C.; Napolitano, E.; Musumeci, D.; Montesarchio, D. Dimeric and Multimeric DNA Aptamers for Highly Effective Protein Recognition. *Molecules* **2020**, *25*, 5227, doi:10.3390/molecules25225227.
245. Omer, M.; Andersen, V.L.; Nielsen, J.S.; Wengel, J.; Kjems, J. Improved Cancer Targeting by Multimerizing Aptamers on Nanoscaffolds. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2020**, *22*, 994–1003, doi:10.1016/j.omtn.2020.10.013.
246. Wang, Z.; Yang, X.; Lee, N.Z.; Cao, X. Multivalent Aptamer Approach: Designs, Strategies, and Applications. *Micromachines* **2022**, *13*, 436, doi:10.3390/mi13030436.
247. Hamidi, S.V.; Jahromi, A.K.; Hosseini, I.I.; Moakhar, R.S.; Collazos, C.; Pan, Q.; Liang, C.; Mahshid, S. Surface-Based Multimeric Aptamer Generation and Bio-Functionalization for Electrochemical Biosensing Applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2024**, *63*, e202402808, doi:10.1002/anie.202402808.
248. Zou, Z.; Younas, T.; Dumsday, G.; Haritos, V.S.; He, L. Rapid Production of Multimeric RNA Aptamers Stabilized by a Designed Pseudo-circular Structure in *E. Coli*. *Biotechnology Journal* **2023**, *18*, 2200390, doi:10.1002/biot.202200390.
249. Sapozhnikova, K.A.; Slesarchuk, N.A.; Orlov, A.A.; Khvatov, E.V.; Radchenko, E.V.; Chistov, A.A.; Ustinov, A.V.; Palyulin, V.A.; Kozlovskaya, L.I.; Osolodkin, D.I.; et al.



- Ramified Derivatives of 5-(Perylen-3-Ylethynyl)Uracil-1-Acetic Acid and Their Antiviral Properties. *RSC Adv.* **2019**, *9*, 26014–26023, doi:10.1039/C9RA06313G.
250. Newkome, G.R.; Weis, C.D. 6,6- *Bis*(Carboxy-2-Oxabutyl)-4,8-Dioxaundecane-I,II-Dicarboxylic Acid. *Org. Prep. Proced. Int.* **1996**, *28*, 242–244, doi:10.1080/00304949609356531.
251. Newkome, G.R.; Lin, X. Symmetrical, Four-Directional, Poly(Ether-Amide) Cascade Polymers. *Macromolecules* **1991**, *24*, 1443–1444, doi:10.1021/ma00006a042.
252. Li, Y.; Lou, Z.; Li, H.; Yang, H.; Zhao, Y.; Fu, H. Bioorthogonal Ligation and Cleavage by Reactions of Chloroquinoxalines with *Ortho* -Dithiophenols. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 3671–3677, doi:10.1002/anie.201913620.
253. Warminski, M.; Kowalska, J.; Jemielity, J. Synthesis of RNA 5'-Azides from 2'- *O* -Pivaloyloxymethyl-Protected RNAs and Their Reactivity in Azide–Alkyne Cycloaddition Reactions. *Org. Lett.* **2017**, *19*, 3624–3627, doi:10.1021/acs.orglett.7b01591.
254. Khan, S.I.; Beilstein, A.E.; Tierney, M.T.; Sykora, M.; Grinstaff, M.W. Solid-Phase Synthesis and Photophysical Properties of DNA Labeled at the Nucleobase with Ru(Bpy)<sub>2</sub>(4-m-4'-Pa-Bpy)<sup>2+</sup>. *Inorg. Chem.* **1999**, *38*, 5999–6002, doi:10.1021/ic990810f.
255. Svenson, S.; Case, R.I.; Cole, R.O.; Hwang, J.; Kabir, S.R.; Lazarus, D.; Lim Soo, P.; Ng, P.-S.; Peters, C.; Shum, P.; et al. Tumor Selective Silencing Using an RNAi-Conjugated Polymeric Nanopharmaceutical. *Mol. Pharmaceutics* **2016**, *13*, 737–747, doi:10.1021/acs.molpharmaceut.5b00608.
256. Tsuchikama, K.; Anami, Y.; Ha, S.Y.Y.; Yamazaki, C.M. Exploring the next Generation of Antibody–Drug Conjugates. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2024**, *21*, 203–223, doi:10.1038/s41571-023-00850-2.
257. Wang, Z.; Li, H.; Gou, L.; Li, W.; Wang, Y. Antibody–Drug Conjugates: Recent Advances in Payloads. *Acta Pharm. Sinica B* **2023**, *13*, 4025–4059, doi:10.1016/j.apsb.2023.06.015.
258. Conilh, L.; Sadilkova, L.; Viricel, W.; Dumontet, C. Payload Diversification: A Key Step in the Development of Antibody–Drug Conjugates. *J. Hematol. Oncol.* **2023**, *16*, 3, doi:10.1186/s13045-022-01397-y.
259. Journeaux, T.; Bernardes, G.J.L. Homogeneous Multi-Payload Antibody–Drug Conjugates. *Nat. Chem.* **2024**, *16*, 854–870, doi:10.1038/s41557-024-01507-y.
260. Mao, Y.; Wei, D.; Fu, F.; Wang, H.; Sun, Z.; Huang, Z.; Wang, Y.; Zhang, G.; Zhang, X.; Jiang, B.; et al. Development of a MMAE-Based Antibody-Drug Conjugate Targeting B7–H3 for Glioblastoma. *Eur. J. Med. Chem.* **2023**, *257*, 115489, doi:10.1016/j.ejmech.2023.115489.

261. Gan, H.K.; Parakh, S.; Osellame, L.D.; Cher, L.; Uccellini, A.; Hafeez, U.; Menon, S.; Scott, A.M. Antibody Drug Conjugates for Glioblastoma: Current Progress towards Clinical Use. *Exp. Opin. Biol. Ther.* **2023**, *23*, 1089–1102, doi:10.1080/14712598.2023.2282729.
262. Santarpia, G.; Carnes, E. Therapeutic Applications of Aptamers. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 6742, doi:10.3390/ijms25126742.
263. Zhu, L.; Yang, J.; Ma, Y.; Zhu, X.; Zhang, C. Aptamers Entirely Built from Therapeutic Nucleoside Analogues for Targeted Cancer Therapy. *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144*, 1493–1497, doi:10.1021/jacs.1c09574.
264. Gao, F.; Yin, J.; Chen, Y.; Guo, C.; Hu, H.; Su, J. Recent Advances in Aptamer-Based Targeted Drug Delivery Systems for Cancer Therapy. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2022**, *10*, 972933, doi:10.3389/fbioe.2022.972933.
265. Jabbari, A.; Sameiyan, E.; Yaghoobi, E.; Ramezani, M.; Alibolandi, M.; Abnous, K.; Taghdisi, S.M. Aptamer-Based Targeted Delivery Systems for Cancer Treatment Using DNA Origami and DNA Nanostructures. *Int. J. Pharm.* **2023**, *646*, 123448, doi:10.1016/j.ijpharm.2023.123448.
266. Mahmoudian, F.; Ahmari, A.; Shabani, S.; Sadeghi, B.; Fahimirad, S.; Fattahi, F. Aptamers as an Approach to Targeted Cancer Therapy. *Cancer Cell Int.* **2024**, *24*, 108, doi:10.1186/s12935-024-03295-4.
267. Li, N.; Nguyen, H.H.; Byrom, M.; Ellington, A.D. Inhibition of Cell Proliferation by an Anti-EGFR Aptamer. *PLoS One* **2011**, *6*, e20299, doi:10.1371/journal.pone.0020299.
268. Esposito, C.L.; Passaro, D.; Longobardo, I.; Condorelli, G.; Marotta, P.; Affuso, A.; De Franciscis, V.; Cerchia, L. A Neutralizing RNA Aptamer against EGFR Causes Selective Apoptotic Cell Death. *PLoS One* **2011**, *6*, e24071, doi:10.1371/journal.pone.0024071.
269. Ray, P.; Cheek, M.A.; Sharaf, M.L.; Li, N.; Ellington, A.D.; Sullenger, B.A.; Shaw, B.R.; White, R.R. Aptamer-Mediated Delivery of Chemotherapy to Pancreatic Cancer Cells. *Nucleic Acid Ther.* **2012**, *22*, 295–305, doi:10.1089/nat.2012.0353.
270. Wu, X.; Liang, H.; Tan, Y.; Yuan, C.; Li, S.; Li, X.; Li, G.; Shi, Y.; Zhang, X. Cell-SELEX Aptamer for Highly Specific Radionuclide Molecular Imaging of Glioblastoma In Vivo. *PLoS One* **2014**, *9*, e90752, doi:10.1371/journal.pone.0090752.
271. Zavyalova, E.; Turashev, A.; Novoseltseva, A.; Legatova, V.; Antipova, O.; Savchenko, E.; Balk, S.; Golovin, A.; Pavlova, G.; Kopylov, A. Pyrene-Modified DNA Aptamers with High Affinity to Wild-Type EGFR and EGFRvIII. *Nucleic Acid Ther.* **2020**, *30*, 175–187, doi:10.1089/nat.2019.0830.

272. Roberts, T.C.; Langer, R.; Wood, M.J.A. Advances in Oligonucleotide Drug Delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2020**, *19*, 673–694, doi:10.1038/s41573-020-0075-7.
273. Jin, C.; El-Sagheer, A.H.; Li, S.; Vallis, K.A.; Tan, W.; Brown, T. Engineering Enzyme-Cleavable Oligonucleotides by Automated Solid-Phase Incorporation of Cathepsin B Sensitive Dipeptide Linkers. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, *61*, e202114016, doi:10.1002/anie.202114016.
274. Wang, Z.; Fan, X.; Mu, G.; Zhao, X.; Wang, Q.; Wang, J.; Tang, X. Cathepsin B-Activatable Cyclic Antisense Oligonucleotides for Cell-Specific Target Gene Knockdown in Vitro and in Vivo. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2023**, *33*, 548–558, doi:10.1016/j.omtn.2023.07.022.
275. Jin, C.; Li, S.; Vallis, K.A.; El-Sagheer, A.H.; Brown, T. Modular and Automated Synthesis of Oligonucleotide-Small Molecule Conjugates for Cathepsin B Mediated Traceless Release of Payloads. *RSC Chem. Biol.* **2024**, *5*, 738–744, doi:10.1039/D4CB00112E.
276. Balamkundu, S.; Liu, C.-F. Lysosomal-Cleavable Peptide Linkers in Antibody–Drug Conjugates. *Biomedicines* **2023**, *11*, 3080, doi:10.3390/biomedicines11113080.
277. Shen, L.; Sun, X.; Chen, Z.; Guo, Y.; Shen, Z.; Song, Y.; Xin, W.; Ding, H.; Ma, X.; Xu, W.; et al. ADCdb: The Database of Antibody–Drug Conjugates. *Nucleic Acids Research* **2024**, *52*, D1097–D1109, doi:10.1093/nar/gkad831.
278. Xi, M.; Zhu, J.; Zhang, F.; Shen, H.; Chen, J.; Xiao, Z.; Huangfu, Y.; Wu, C.; Sun, H.; Xia, G. Antibody-Drug Conjugates for Targeted Cancer Therapy: Recent Advances in Potential Payloads. *Eur. J. Med. Chem.* **2024**, *276*, 116709, doi:10.1016/j.ejmech.2024.116709.
279. Johnsen, K.B.; Burkhart, A.; Thomsen, L.B.; Andresen, T.L.; Moos, T. Targeting the Transferrin Receptor for Brain Drug Delivery. *Progr. Neurobiol.* **2019**, *181*, 101665, doi:10.1016/j.pneurobio.2019.101665.
280. Sahtoe, D.D.; Coscia, A.; Mustafaoglu, N.; Miller, L.M.; Olal, D.; Vulovic, I.; Yu, T.-Y.; Goresnik, I.; Lin, Y.-R.; Clark, L.; et al. Transferrin Receptor Targeting by de Novo Sheet Extension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2021**, *118*, e2021569118, doi:10.1073/pnas.2021569118.
281. Barker, S.J.; Thayer, M.B.; Kim, C.; Tatarakis, D.; Simon, M.J.; Dial, R.; Nilewski, L.; Wells, R.C.; Zhou, Y.; Afetian, M.; et al. Targeting the Transferrin Receptor to Transport Antisense Oligonucleotides across the Mammalian Blood-Brain Barrier. *Sci. Transl. Med.* **2024**, *16*, eadi2245, doi:10.1126/scitranslmed.adi2245.
282. Li, Y.; Song, L.; Wang, B.; He, J.; Li, Y.; Deng, Z.; Mao, C. Universal pH-Responsive and Metal-Ion-Free Self-Assembly of DNA Nanostructures. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 6892–6895, doi:10.1002/anie.201804054.

283. Prokhorov, V.V.; Klinov, D.V.; Chinarev, A.A.; Tuzikov, A.B.; Gorokhova, I.V.; Bovin, N.V. High-Resolution Atomic Force Microscopy Study of Hexaglycyclamide Epitaxial Structures on Graphite. *Langmuir* **2011**, *27*, 5879–5890, doi:10.1021/la103051w.